

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 88400330.2

51 Int. Cl.4: **C 12 N 15/00**
// C12N9/06

22 Date de dépôt: 15.02.88

30 Priorité: 16.02.87 FR 8701925
27.07.87 FR 8710621

43 Date de publication de la demande:
21.09.88 Bulletin 88/38

84 Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Demandeur: **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE**
AGRONOMIQUE
145, rue de l'Université
F-75341 Paris Cédex 07 (FR)

72 Inventeur: **Huttener, Eric**
2, rue de la Durance
F-75012 Paris (FR)

Calza, Roger
24, les Nouveaux Horizons
F-78310 Elancourt (FR)

Caboche, Michel
5, rue du Thinerai
F-78310 Maurepas (FR)

Vaucheret, Hervé
15, rue Léon Bloy
F-92260 Fontenay-Aux-Roses (FR)

74 Mandataire: **Warcoln, Jacques et al**
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

54 **Vecteur de clonage du gène de structure de la nitrate réductase et sonde d'ADN obtenue.**

57 La présente invention concerne un vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire d' l'ARNm de la nitrate réductase de tabac.

Description

"VECTEUR DE CLONAGE DU GENE DE STRUCTURE DE LA NITRATE REDUCTASE ET SONDE D'ADN OBTENUE"

5 Le domaine technique de la présente invention est celui de l'isolement de gènes de structure de protéines à partir d'espèces végétales. Plus particulièrement, l'invention concerne le clonage de fragments d'ADN complémentaire de l'ARN de la nitrate réductase de tabac et codant pour des épitopes communs aux nitrates réductases (NR) des plantes supérieures. L'invention concerne donc également les clones obtenus, l'ADNc isolé selon l'invention codant pour plus de 50 % de l'ARNm de la NR de tabac.

10 La présente invention concerne également des vecteurs de clonage comportant un fragments d'ADNc de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac comprenant la séquence codante de nucléotides partielle ou complète.

15 La nitrate réductase (NR) est une enzyme clé qui rentre en jeu dans la première étape de l'assimilation du nitrate dans les plantes. Or, l'assimilation des nitrates constitue une étape limitante du développement des plantes. Par conséquent, le clonage du gène de structure de la NR et sa réintroduction dans une plante est du plus haut intérêt pour modifier les caractéristiques d'assimilation des nitrates par les plantes. Une majorité des plantes assimilent, par exemple, exculsivement au niveau racinaire. Mais il serait avantageux, pour certaines plantes, d'assimiler les nitrates au niveau racinaire, en particulier pour les espèces stockant leurs réserves dans les racines ou tubercules telles que la pomme de terre. En revanche, certaines espèces ligneuses, comme les arbres fruitiers, assimilent beaucoup de nitrates au niveau racinaire et leur assimilation foliaire serait mieux adaptée à la fructification.

20 Chez les monocotylédones, les nitrates doivent être apportés à des stades critiques du développement, ce qui suggère que l'assimilation des nitrates n'est pas effectuée de façon uniforme dans le temps chez ces plantes. Certaines espèces ne semblent plus assimiler les nitrates lorsque les graines commencent à se développer, épuisant ainsi les réserves en azote réduit foliaire. Introduire des gènes de nitrate réductase dont "la mise à feu" sera différente de celle observée pour le gène résidant permettra d'obtenir des plantes ayant des caractéristiques de culture et de production améliorées.

25 Dans le domaine de l'enzymologie (enzymes fixées), la nitrate réductase est une protéine qui porte dans sa structure quatre sites d'attachement de cofacteurs : NADH, FAD, cytochrome b₅₅₇, cofacteur à molybdène (MoCo). L'obtention de fragments polypeptidiques correspondant à une partie de l'enzyme (synthétisée dans E. coli à partir de fragments d'ADNc grâce à l'emploi d'un vecteur d'expression) permet d'envisager la mise au point de colonnes d'affinité pour ces molécules. La nitrate réductase catalyse une série d'étapes d'oxydoréduction (NADH \rightleftharpoons NAD⁺ ; FADH \rightleftharpoons FAD⁺); cyt b₅₅₇ red \rightleftharpoons cyt b₅₅₇ ox; MoCo red \rightleftharpoons MoCo ox ; NO₃⁻ \rightleftharpoons NO₂⁻; Fe³⁺ \rightleftharpoons Fe²⁺). Ceci peut être utilisé, par exemple, pour éliminer les nitrites toxiques en les convertissant en nitrates, et aussi pour mesurer les concentrations de ces molécules grâce à son emploi dans des capteurs à sonde protéique (électrode à enzyme).

35 Dans le domaine des cultures cellulaires, certaines lignées cellulaires ne produisent de métabolites secondaires que dans certaines conditions de croissance particulières (carence en sucres ou en source azotée). L'introduction de gènes de NR à expression contrôlée dans des cellules récipients NR⁻ obtenues par mutagenèse permettra d'induire à volonté une carence éventuelle en source azotée grâce à emploi de promoteurs adaptés et de favoriser ainsi la production de l'alcaloïde désiré.

40 C'est pourquoi la présente invention concerne plus particulièrement un vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac.

45 Parmi ces vecteurs, il faut citer les vecteurs comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac comportant, sur un fragment EcoRI/EcoRI de cet ADNc, dans l'ordre, les sites suivants : XmnI, HindIII, KpnI, EcoRI, ou KpnI, HindIII, XmnI, EcoRI.

Ces vecteurs sont, de préférence, des vecteurs constitué d'un phage dans lequel est inséré l'ADNc.

Plus particulièrement, les ADNc isolés dans les exemples représentent plus de 50 % de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac. Les inserts d'ADNc ont, en général, plus de 1,6 kb.

50 La présente invention a également pour objet un vecteur de clonage comportant un fragment d'ADNc de l'ARNm de la nitrate réductase comportant la séquence codante de nucléotides suivante :

55

60

GAA TTC CCT TGT AGA GAA TTG CCC GTT ACG GTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA ACG AAA GAA CAG
AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GGC GCC GCT GCC GTT TCA ACA ACG ATA TGG
CGC GGG GTA CCC CTC CGC GCT TTG GTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG
CIT AAT GTT TGC TTC GAA GGA GCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT GGT TCA AAG TAT GGA ACC
AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA ATG GAT CCA GCA CGA GAT ATC ATC GTA GCC TAC ATG CAG AAC
GGA GAA AAA TTG GCA CCC GAC CAC GGG TTT CCA GTA CGA ATG ATA ATT CCA GGA TTC ATT GGA
GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA AAG AGG ATT ATA GTC ACC ACC CAA GAA TCA GAC ACG TAT TAT
CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT GAA CTT GCA AAT ACC GAA GCA
TGG TGG TAC AAG CCA GAG TAT ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT GTC ATT ACG ACG CCG
TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC TGG ACG ACT CAG CGA CCT TAC ACG TTG AGG GGC
TAT TCT TAT TCT GGC GGA GGG AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA GGA GAA
ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC ACC AAA TAT GGC AAG TAC TGG TGT
TGG TGC TTT TGG TCA CTC GAG GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT
CGA GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT ATT TGG AAC GTC ATG GGA ATG
ATG AAT AAT TGG TGG TTC CGA GTA AAG ATG AAT GTG TGC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA
ATA GTG TTT GAG CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAC CAA TCA GGT GGA TGG ATG CGC AAG GAG AGA
CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG GCA CCT CAA ACA CTA AAG AAG AGT ATC TCA ACT CCA TTC ATG
AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC TCC ATG TCC GAG GTC ACG AAA CAC AGC TCT GCT GAC TCT GCT
TGG ATC ATA GTC CAT GGT CAT ATC TAT GAC GCC ACG CGT TTC TTG AAA GAT CAC CCT GGT GGG
ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GGC ACT GAT TGC ACT GAG GAA TTT GAT GCA ATT TAT TCT
CAT AAG GCT AAG AAG CTC TTG GAG GAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT TAC ACC
TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GGA TCT TCT TCC TTC ACC AGC TTT CTA GCA CCT ATT
AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA
CTC ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT CGA TTT GCA TTG CCC TCT GAG
GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT GTT GGA AAA CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC GAT AAG
CTC TGC ATG CGC GCT TAC ACG CCT ACT AGC ACG ATC GAT GAG GTG GGG TAC TTC GAG TTG GTT
GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA ATT

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Enfin, la présente invention a également pour objet un vecteur de clonage comportant un fragment d'ADNc de l'ARNm de nitrate réductase de tabac comprenant la séquence complète de nucléotides suivante :

ATG GCG GCA TCT GTC GAA AAC AGG CAG
 TTC AGT CAC CTA GAA GCC GGT TTA TCC CGG TCT TTC AAG CCC
 CGG TCT GAT TCC CCG GTT CGT GGC TGC AAC TTC CCT TCG CCC
 AAC AGT ACT AAT TTC CAA AAG AAA CCA AAT TCC ACC ATT TAC
 CTT GAT TAC TCG TCG AGT GAA GAC GAC GAT GAT GAT GAC GAA
 AAA AAT GAG TAC CTT CAA ATG ATT AAA AAA GGG AAT TCA GAG
 TTA GAG CCA TCT GTT CAT GAC ACT AGG GAC GAA GGT ACC GCT
 GAT AAT TGG ATT GAA CGC AAC TTT TCC ATG ATT CGT CTC ACC
 GGA AAG CAT CCA TTT AAC TCC GAA CCA CCG TTG AAC CGG CTC
 ATG CAC CAC GGC TTT ATC ACA CCG GTC CCA CTT CAT TAC GTT
 CGT AAC CAT GGA CCG GTT CCC AAG GGC ACG TGG GAT GAC TGG
 ACC GTG GAA GTC ACG GGA CTA GTG AAG CGT CCT ATG AAA TTC
 ACA ATG GAC CAG TTG GTT AAC GAA TTC CCT TGT AGA GAA TTG
 CCC GTT ACG CTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA AGG AAA GAA CAG
 AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GGC GCC GCT
 GCC GTT TCA ACA ACG ATA TGG CGC GGG GTA CCC CTC CGC GCT
 TTG CTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG
 CTT AAT GTT TGC TTC GAA GGA GCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT
 GGT GGT TCA AAG TAT GGA ACC AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA
 ATG GAT CCA GCA CGA GAT ATC ATC GTA GCC TAC ATG CAG AAC
 GGA GAA AAA TTG GCA CCC GAC CAC GGG TTT CCA GTA CGA ATG
 ATA ATT CCA GGA TTC ATT GGA GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA
 AAG AGG ATT ATA GTC ACC ACC CAA GAA TCA GAC AGC TAT TAT
 CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT
 GAA CTT GCA AAT ACC GAA GCA TGG TGG TAC AAG CCA GAG TAT
 ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT GTC ATT ACG ACG CCG
 TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC TGG ACG ACT CAG
 CGA CCT TAC ACG TTG AGG GGC TAT TCT TAT TCT GGC GGA GGG
 AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA GGA GAA
 ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC ACC
 AAA TAT GGC AAG TAC TGG TGT TGG TGC TTT TGG TCA CTC GAG
 GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT
 CGA GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT

ATT TGG AAC GTC ATG GGA ATG ATG AAT AAT TGC TGG TTC CGA
 GTA AAG ATG AAT GTG TGC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA
 ATA GTG TTT GAG CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAC CAA TCA GGT 5
 GGA TGG ATG GCG AAG GAG AGA CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG
 GCA CCT CAA ACA CTA AAG AAG AGT ATC TCA ACT CCA TTC ATG
 AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC TCC ATG TCC GAG GTC AGG AAA 10
 CAC AGC TCT GCT GAC TCT GCT TGG ATC ATA GTC CAT GGT CAT
 ATC TAT GAC GCC ACG CGT TTC TTG AAA GAT CAC CCT GGT GGG
 ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GGC ACT GAT TGC ACT GAG 15
 GAA TTT GAT GCA ATT CAT TCT GAT AAG GCT AAG AAG CTC TTG
 GAG GAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT TAC ACC
 TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GGA TCT TCT TCC TTC 20
 AGC AGC TTT CTA GCA CCT ATT AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG
 AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA 25
 CTC ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT
 CGA TTT GCA TTG CCC TCT GAG GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT
 GTT GGA AAA CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC GAT AAG 30
 CTC TGC ATG CGC GCT TAC ACG CCT ACT AGC ACG ATC GAT GAG
 GTG GGG TAC TTC GAG TTG GTT GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA
 ATT CAC CCT AAA TTC CCC AAT GGA GGG CAA ATG TCA CAG TAT 35
 CTT GAT TCT ATG CCG TTA GGG TCA TTT CTC GAC GTG AAA GGT
 CCA TTA GGT CAC ATT GAA TAC CAA GGA AAG GGA AAT TTC TTA
 GTT CAT GGC AAA CAG AAG TTT GCC AAG AAG TTG GCC ATG ATA 40
 GCA GGT GGA ACA GGA ATA ACT CCA GTG TAT CAA GTC ATG CAG
 GCA ATT CTG AAA GAT CCA GAA GAT GAC ACA GAA ATG TAT GTG
 GTG TAT GCT AAC AGA ACA GAG GAT GAT ATT TTA CTT AAG GAA 45
 GAG CTT GAT TCA TGG GCT GAG AAA ATT CCA GAG AGG GTT AAA
 GTT TGG TAT GTG GTT CAG GAT TCT ATT AAA GAA GGA TGG AAG
 TAC AGC ATT GGT TTT ATT ACA GAA GCC ATT TTG AGA GAA CAT 50
 ATC CCT GAG CCA TCT CAC ACA ACA CTG GCT TTG GCT TGT GGA
 CCA CCT CCT ATG ATT CAA TTT GCT GTT AAT CCA AAC TTG GAG
 AAG ATG GGC TAT GAC ATT AAG GAT TCC TTA TTG GTG TTC TAA 55

60

La présente invention a en outre pour objet les sondes d'ADNc de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac

65

comportant les séquences codantes de nucléotides ci-dessus.

Ces sondes peuvent être exploitées notamment pour l'isolement du gène correspondant qui permet de créer des plants différents dans leurs caractéristiques d'assimilation des nitrates.

L'invention sera maintenant mieux comprise à la lumière de la description détaillée qui va suivre. Celle-ci comprend notamment une série d'exemples. Elle est faite en référence à des figures dans lesquelles sont présentés :

- figure 1 : la traduction acellulaire dans un système réticulocyte de l'ARN messager codant pour l'apoenzyme NR ; les ARNm PolyA⁺ ont été isolés de jeunes feuilles de tabac et traduits en dehors de la cellule ; les produits de translation ont été fractionnés sur gel dénaturant polyacrylamide 5 %.

- figure 2 : le criblage immunologique d'une banque d'ADNc de tabac.

- figure 3 : le diagramme d'une famille de clones s'hybridant avec le fragment EcoRI de 1,6 kb.

- figure 4 : une analyse de "western blot" des protéines de fusion synthétisées par divers lysogènes.

- figure 5 : l'inhibition de l'activité catalytique de la NR de tabac par des immunoglobulines immunosélectionnées par adsorption sur des plaques formées par des phages lambdaCT11 et 13-29 en présence d'IPTG.

- figure 6 : une analyse de "northern blot" des séquences d'ARNm s'hybridant avec le fragment EcoRI de 1,6 kb.

- figure 7 : une analyse de "southern blot" des séquences génomiques de tabac homologues du fragment EcoRI de 1,6 kb.

- Les figures 8a et 8b représentent une séquence partielle de nucléotides de l'insert d'ADNc du phage recombinant lambda 13-29, et la séquence d'acides aminés correspondante de la partie d'ADNc codée de la protéine de fusion exprimée par ce phage. Les nucléotides sont représentés sur la ligne supérieure et les acides aminés sur la ligne inférieure. Ils sont les uns et les autres numérotés sur la colonne de droite. Les nucléotides aux extrémités, représentés en petites lettres, correspondent aux séquences de la bêta-galactosidase.

Les séquences soulignées se réfèrent aux deux sites analysés dans les figures 9a et 9b.

- Les figures 9a et 9b représentent l'alignement de la séquence d'acides aminés de la nitrate réductase dans le site d'attachement à l'hème et les sites FAD/NADH avec les protéines de la superfamille du cytochrome b5 et la réductase de cytochrome b5 d'érythrocyte humain (RDHUB5). Les séquences identiques avec la NR de tabac sont encadrées. Les restes du site d'attachement à l'hème ont été numérotés selon les conventions pour le cytochrome b5 de bovin avec les deux histidines liant à l'hème numérotées His-39 et His-63 (B ?). Le site FAD/NADH a été numéroté à partir du reste N-terminal de la réductase de cytochrome b5.

- La figure 10 représente l'alignement de la séquence d'acide aminé de la nitrate réductase en première ligne et la séquence codante complète correspondante en seconde ligne.

Le façon générale, le processus expérimental repose sur le fait que les ARN messagers codant l'apoenzyme de nitrate réductase du tabac peuvent être traduits dans un système acellulaire.

Des fractions d'ARNm polyA⁺ de la plage 23-32s d'un gradient de saccharose ont été utilisées pour construire une banque d'ADNc dans le vecteur d'expression lambdaCT11 avec une efficacité de clonage d'environ 10⁴ recombinants/ng d'ARNm. Les clones recombinants ont été triés avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la nitrate réductase de maïs qui réagit spécifiquement avec les nitrates réductases de dicotylédones. Parmi 240 000 plages de lyse de recombinants, 8 clones ont été isolés contenant des inserts de tailles s'étalant de 1,6 kb à 2,1 kb et ayant en commun des homologies de séquences. 7 de ces clones contenaient un fragment EcoRI de 1,6 kb interne commun. L'identité de ces clones a été confirmée de la manière suivante : une protéine de fusion de 170 kd pouvant être induite par IPTG et reconnue par l'anticorps de la NR de lapin a été exprimée par un dérivé de lysogène à partir d'un des recombinants. Les anticorps couplant les protéines fusionnées ont été élués et se sont révélés inhibiteurs de l'activité catalytique de la NR de tabac. Les anticorps monoclonaux dirigés contre la NR ont aussi été capables de coupler les protéines hybrides. Quand on a utilisé le fragment EcoRI de 1,6 kb comme sonde pour les expériences de "northern blot", on a détecté un signal correspondant à un ARN de 3,5 kb dans les préparations d'ARNm de *N. plumbaginifolia* et de tabac mais aucune hybridation croisée avec des ARNm de maïs n'a été détectée. La sonde s'est hybridée avec des séquences à faible nombre de copies dans les taches génomiques d'ADN de tabac.

EXEMPLE 1

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DE L'ARNm PolyA⁺

L'ARN total a été extrait des tissus de feuilles de tabac selon une procédure proche de Chirgwin (Biochemistry 18, 5294-5299 (1979)). Des feuilles de tabac ont été gelées dans N₂ liquide et broyées dans un mortier. La poudre a été mélangée rapidement avec 100 ml de tampon Tris-HCl pH 8,0 50 mM contenant de l'EDTA 10 mM, du thiocyanate de guanidinium 5 M, du sodium N laurylsarcosine 2 % et du 2-mercaptoéthanol 5 % (v/v). Après incubation à 65° C pendant 20 minutes et centrifugation à 20 000 g pendant 30 minutes, les surnageants ont été ajustés à 0,1 g/ml de CsCl et étalés sur des coussins de 12 ml de C₃ Cl 5,7 M et EDTA 50 mM, pH 8,0 dans des tubes de 30 ml de polyallomères. Les tubes ont été centrifugés pendant 20 heures à 25 000 rpm dans un rotor SW27 à 15° C. Les culots d'ARN ont été dissous dans du Tris 10 mM pH 8,0 et EDTA 1

mM, et du SDS 0,05 % et mis en incubation à 55°C pendant 30 minutes en présence de 200 µg/ml de protéinase K. Après le traitement PMSF pour désactiver la protéinase K, des échantillons ont été extraits par le phénol, phénolchloroforme, chloroforme et précipité éthanol. Le rendement était en général de 200 à 300 µg d'ARN total par gramme de tissu frais. Les ARNm PolyA⁺ ont été purifiés par deux cycles de sélection d'une colonne d'oligocellulose (PL biochemical) selon la procédure de Bantle (1978) (Anal. Biochem. 70, 75-85) comprenant une étape de dénaturation de l'ARN dans du DMSO 80 % à 55°C pour le second cycle de sélection. 5

Les ARNm PolyA⁺ représentaient en général 1 à 1,2 % de l'ARN de feuille total et contenaient moins de 10 % d'ARN ribosomal. On a fractionné les ARNm PolyA⁺ (100 µg/tube) sur des gradients de saccharose linéaires de 12 ml de 5 à 20 % faits dans un tampon TE par centrifugation pendant 16 heures à 100 000 g dans un rotor SW40 selon la procédure décrite par Commere dans Plant. Sci. (1986) 44, 191-203. 10

EXEMPLE 2

TRADUCTION ACELLULAIRE D'ARNm ET IMMUNOSELECTION DES PRODUITS DE TRADUCTION (figure 1) 15

Des ARNm PolyA⁺ totaux ou fractionnés ont été traduits dans un système de traduction acellulaire de réticulocyte de lapin (Amersham) utilisant de la méthionine marquée S³⁵ (900 Ci mmole, 1 mCi/ml, Amersham). On a ajouté environ 0,05 à 0,1 µg d'ARNm et 1,2 µCi de méthionine S³⁵ par µl de lysat. Après incubation pendant 1 heure à 30°C, des prélèvements du mélange de traduction ont été analysés par SDS-PAGE. Les produits de traduction correspondant à 50 µg de lysat ont été immunosélectionnés pour des fragments de polypeptides de NR en les passant à travers une colonne de protéine A-Sepharose 4B sur laquelle 20 µl d'antisérum spécifique de NR avaient été fixés dans du tampon TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, EDTA 1 mM, Tween 20 0,5 % (w/v), 150 mM NaCl, NaN₃ 0,2 %). Après adsorption du lysat dilué dans le tampon TNE, la colonne a été lavée avec du tampon TNE contenant de la méthionine froide 1 mM et du NaCl 1 M, ainsi que du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Le matériau lié à la protéine A a été ensuite élué et dénaturé dans un tampon Laemmli pour SDS-PAGE. 20 25

Le criblage immunologique d'une banque d'expression d'ADNc demande que le nouveau produit de traduction puisse être reconnue par les anticorps spécifiques dressés contre des chaînes polypeptidiques développées dans des cellules d'eucaryotes. Ces anticorps peuvent ne pas reconnaître les chaînes d'antigènes non modifiés synthétisés dans l'hôte de clonage E. coli. La démonstration préalable de la faisabilité de cette approche dans le cas de la NR a été obtenue en montrant qu'un anticorps polyclonal contre la NR de maïs (alpha MNR) pouvait être utilisé pour immunosélectionner une chaîne de polypeptides de NR de tabac parmi les produits de traduction acellulaire d'ARN PolyA⁺ total extrait des feuilles (Figure 1). L'anticorps polyclonal a été dressé contre la NR de feuille de maïs. L'anticorps polyclonal a reconnu spécifiquement la NR de tabac dans les "western blots" et les produits de traduction acellulaire correspondants dans les lysats de réticulocyte de lapin. 30 35

Les signaux obtenus étaient très faibles, la NR représentant 2 à 5/10 000 du total des protéines de feuille de tabac solubles. Les produits de traduction acellulaire ont migré près des sous-unités d'enzyme de 110 kd. Des résultats semblables avaient été obtenus antérieurement avec l'ARNm de NR de maïs. 40

EXEMPLE 3

CONSTRUCTION DE BANQUES D'ADNc DE FEUILLES DE TABAC DANS LE PHAGE lambdaGT11

On a synthétisé des ADNc selon Gubler et Hoffmann (1983) (Gene 25, 263-269) avec les modifications suivantes : 200 ng d'ARNm PolyA⁺ total ont été dénaturés par chauffage à 70°C pendant 2 minutes dans de l'eau et soumis à une reverse-transcription à pH 8,3 en utilisant 14 U de reverse transcriptase AMV (GenoFit) dans un volume final de 40 µl en présence de 0,1 µg d'oligo dT (15 mere, Pharmacia) à 42°C pendant 40 minutes. L'efficacité de la synthèse du premier brin variait entre 8 et 25 %. Le second brin a été synthétisé à partir du premier en présence de 0,8 U de RNase H (BRL), et 4 U de ligase d'ADN de E. coli (Biolabs), utilisant 40 U d'ADN poll holoenzyme (Amersham) dans un volume final de 90 µl. L'incubation a été effectuée à 12°C pendant 1 heure et ensuite à 16°C pour 1 heure de plus. Les extrémités de l'ADN double brin ont été polies par incubation avec une unité d'ADN polymérase T₄ à 37°C pendant 15 minutes. L'efficacité de la synthèse du deuxième brin était proche de 100 %. L'ADNc obtenu (environ 100 ng) a été ensuite méthylé avec 20 U d'EcoRI méthylase. Pour améliorer l'efficacité du clonage (10 fois) une étape de digestion des régions simple brin a été incluse dans la procédure de synthèse de l'ADNc entre les étapes de polissage et de méthylation. Les ADNc ont été traités par 2 U de nucléase S₁ (Boehringer) dans un volume de 100 µl pendant 15 minutes à 30°C en vue d'éliminer les extrémités anormales. Ceci a conduit à une baisse de 5 % de la quantité de matière à haut poids moléculaire dans la préparation de l'ADNc. Après addition de "linkers" d'EcoRI à l'ADNc (12 mers phosphorylés, PL, Biochemicals) et deux digestions successives avec EcoRI cocentré, les ADNc ont été fractionnés sur une colonne Sephacryl S-300 et la matière correspondant aux ADNc supérieurs à 0,5 kb a été collectée. L'ADNc a été ligaturé avec le vecteur lambdaGT11 desphosphorylé coupé avec EcoRI dans les conditions spécifiées par Young (1983) (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80, 1194-1198). Le mélange de ligation a été encapsidé en utilisant les lysats d'encapsidation disponibles dans le commerce (Gigapack, Stratagene Cloning System, Clontech Labs. CA). Les banques ont été examinées quant à leur proportion de recombinants sur souche RY1088 en présence d'Xgal et IPTG. Elles contenaient 70 à 80 % de plaques blanches. Une 45 50 55 60 65

proportion significative de ces plaques blanches détectées dans les premières banques a tourné au bleu pâle après nouvel examen sur souche RY1090, et manquait d'inserts détectables. On a trouvé que ceci était en relation avec la faible élimination de petits fragments et "linkers" d'ADNc par chromatographie sur colonne Sépharose 4B et était amélioré par l'utilisation de Séphacryl 9300. Après optimisation, les rendements étaient

5

d'environ 50 000 à 100 000 plaques blanches par ng de d'ADNc parmi lesquelles 50 % contenaient des inserts détectables. Une banque d'ADNc enrichie en séquence d'ARNm de haut poids moléculaire a été réalisée comme suit. On a fractionné 100 µg d'ARNm sur un gradient de saccharose et on a collecté la région 23-32s (10 µg). Cette fraction a été ensuite fractionnée dans un gel d'agarose, 1,5 % contenant 10 mM d'hydroxyde de méthylmercure. La plage correspondant aux poids moléculaires 2-5 kb a été découpée, les ARNm élués,

10

extraits au phénol et utilisés (100 ng) pour construire une banque d'ADNc. Le vecteur de clonage lambdaGT11 a été choisi pour construire des banques d'ADNc car on pensait que les fréquences d'ADNc de NR seraient très faibles et qu'il faudrait cribler de grandes banques. Des banques d'ADNc total ont tout d'abord été construites. Les efficacités initiales de clonage et les proportions de recombinants véritables étaient faibles (moins de 10 000 clones/ng d'ADNc) quand on a suivi la procédure de Gubler et Hoffmann (1983) pour la synthèse des ADNc. L'efficacité de clonage a été accrue en incluant un traitement de nucléase S₁ doux entre les étapes de "healing" et de méthylation de la synthèse d'ADNc et a permis d'obtenir un rendement de clonage supérieure à 10⁵ recombinants/ng d'ADNc. La qualité des banques d'ADNc a aussi été améliorée en fractionnant les ADNc après addition de "linkers" sur des colonnes Sephacryl S300 à la place de colonnes Sepharose 4B.

15

20

Comme l'ARNm codant pour la NR était considéré comme devant être d'une taille supérieure à 3 kb, des préparations d'ARNm ont été fractionnées sur un gradient de saccharose et des molécules avec une constante de sédimentation s'étalant entre 23-32s ont été recueillies. Ces ARNm ont été fractionnés ultérieurement sur un gel d'hydroxyde de méthylmercure et les ARNm migrant dans le domaine de 3 à 4 kb ont été utilisés pour construire une banque d'ADNc (4.10⁵ clones, 70 % de recombinants). Ces deux étapes de purification représentaient un enrichissement de 5 à 10 fois en ARNm de NR.

25

EXEMPLE 4

30

AMPLIFICATION ET CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE DES BANQUES (figure 2)

Les banques ont été amplifiées sur souche RY1088 à une densité de 3.10⁴ à 10⁵ pFu par boîte de 90 mm. Les plaques ont pu croître à 42°C pendant 4 heures. Il en a résulté une amplification de 1 000 fois. Les banques amplifiées ont été étalées sur souche RY1090 à une densité de 1 à 1,5.10⁴ pFu par boîte de 90 mm et ont pu se développer à 42°C pendant 3-4 heures. Des filtres de nitrocellulose (Millipore (HATF)) ont été imprégnés dans de l'IPTG 10 mM puis séchés. Les plaques recouvertes de ces filtres ont été mises en incubation pendant la nuit à 37°C puis réfrigérées à 4°C. Les filtres correspondants ont été bloqués avec de la BSA 3 % dans du TBS pendant 30 minutes, mis en incubation avec l'antisérum (dilué 1/200 dans du TBS) pendant 1-2 heures et lavés trois fois dans TBS contenant du Tween 20 à 0,05 %. Les filtres ont été mis en incubation avec du I¹²⁵-protéine A, 0,5 µCi dans du TBS contenant 50 g/l de lait écrémé et du Tween 20 à 0,05 % pendant 1-2 heures, lavés trois fois dans du TBS contenant du lait et du Tween 20 puis deux fois dans du TBS. Toutes ces étapes ont été exécutées à température ambiante. Les filtres ont été autoradiographiés sur film Kodak XAR5 avec un écran amplifiant Dupont Cronex pendant 18-24 heures. Une moyenne de 1 à 3 taches ont été détectées sur les filtres. Les parties correspondant à ces taches ont été prélevées avec des pipettes Pasteur par l'extrémité large et mises à incuber toute une nuit à 40°C dans 1 ml de diluant lambda. Environ 3 000 plaques par partie ont été

35

40

45

retrouvées pour confirmation. Deux cycles de triage supplémentaire à basse densité (100-200 plaques/boîte) ont été nécessaires pour purifier les recombinants jusqu'à homogénéité. Bien qu'il soit spécifique pour la NR de tabac dans des extraits de feuilles de tabac, l'anticorps alphaMNR a reconnu plusieurs protéines d'E. coli dans des expériences "western blot" (figure 4). Ceci se traduisait par des bruits de fond importants quand les banques étaient filtrées immunologiquement. L'anticorps alphaMNR a donc été mis en incubation avec de grandes quantités d'extraits de protéines bruts d'E. coli et s'est confirmé comme encore capable de détecter de la NR de tabac au niveau du ng. Parmi un total de 40 clones initialement sélectionnés par triage de 240 000 plaques de recombinants, 11 clones exprimant de manière reproductible un signal par triage ont été ensuite purifiés jusqu'à homogénéité. Ceci a demandé, le cas échéant, pour le clone 13-29 à forte expression, le dépôt, le prélèvement et l'amplification de plaques isolées en l'absence d'une induction IPTG pour empêcher l'apparition de clones sans expression pendant la croissance des plaques (figure 2).

55

EXEMPLE 5

60

PREPARATION D'ADN DE PHAGE ET SOUS-CLONAGE DES INSERTS

La procédure de production de phages sur milieu LB solide contenant du glucose et unification par centrifugation sur gradient de densité de chlorure de césium est pour l'essentiel celle de Huynh et al. (1983) (DNA cloning a practical approach IRL Press, Oxford). L'ADN a été extrait à partir de 10¹² phages par traitement avec du formamide 50 % dans du Tris HCl 0,2 M pH 8,5, EDTA 20 mM pendant 2 heures à

65

protéinase K et mis à incuber 2 heures à 37°C. Après extraction de l'éthanol, l'ADN a été précipité et utilisé pour une analyse de restriction. Les fragments EcoRI excisés du vecteur ont été sous-clonés dans le site EcoRI desphosphorylé du plasmide pUC9 selon des procédures standards.

EXEMPLE 6

REACTIFS IMMUNOLOGIQUES POUR LE TRIAGE DES BANQUES

La purification de la nitratre réductase du maïs et l'obtention de l'anticorps polyclonal du lapin (alphaMNR) contre cette enzyme ont déjà été décrites. Pour neutraliser les immunoglobulines anti E. coli contre l'anticorps alphaMNR, le sérum a été dilué 5 fois dans du TBS BSA et mis à incuber avec deux volumes d'un lysat frais d'E. coli (20 mg/ml protéine) préparé par décongélation et sonication de cellules BNN97 en phase de croissance exponentielle et induites pour la production de lambdaGT11, 90 minutes avant récolte. Après incubation pendant 2 heures à 40°C en brassant, le mélange a été centrifugé dans des tubes Eppendorf et la procédure d'addition de lysats et clarification a été répétée deux fois. Le sérum résultant a été maintenu à 4°C avec de l'azide et a pu être utilisé plusieurs fois pour le triage.

EXEMPLE 7

ANALYSE DES CLONES RECOMBINANTS (figure 3)

Les clones purifiés ont été quant à la présence d'inserts d'ADN par digestion d'EcoRI. 7 clones (13-18, 13-20, 13-27, 13-29, 13-33, 13-34, 13-36) contenaient un insert d'EcoRI de 1,6 kb similaire, bien qu'ils donnaient des signaux de différentes intensités par détection immunologique. Le fragment d'EcoRI de 1,6 kb du clone 13-36 a été sous-cloné dans du pUC9 et utilisé comme sonde pour l'étude d'homologies d'inserts parmi les 10 autres recombinants. 7 clones (13-18, 13-20, 13-27, 13-28, 13-29, 13-33, 13-34) se sont hybridés par croisement avec cette sonde. Le clone 13-28 contenait un insert EcoRI de 2 kb. La structure et l'orientation des ADNc dans le site de clonage du vecteur ont été étudiées en utilisant les enzymes de restriction KpnI et SstI. On a trouvé que la taille des inserts dans la majorité des recombinants était supérieure à 1,6 kb donc que le fragment EcoRI de 1,6 kb était interne aux ADNc et entouré de petits fragments d'ADNc qui n'avaient pas été vus sur les digestions d'EcoRI, colorées de bromure d'éthidium, des ADN des phages recombinants. Les inserts ont été trouvés orientés dans les deux directions possibles. Des diagrammes physiques de 3 de ces inserts sont présentés figure 3. De leur comparaison on peut conclure que 2,1 kb d'ARNm ont été clonés. L'absence de certains sites de restriction dans les fragments d'EcoRI de 1,6 kb dans l'insert du clone 13-28 suggère une hétérogénéité parmi les populations d'ARN étudiées. Les 3 clones recombinants restants contenaient des petits inserts hétérologues.

EXEMPLE 8

EXPRESSION D'UNE PROTEINE DE FUSION DANS LE CLONE RECOMBINANT 13-29 (figure 4)

Des lysogènes de phages 13-29 et 13-36 portant des inserts orientés dans les directions opposées ont été construits dans une souche RY1089. Ces lysogènes ont été quant à l'expression d'une protéine hybride par analyse de "western blot" (figure 4). En utilisant l'anticorps polyclonal alphaMNR, une protéine de poids moléculaire d'environ 175 kd a été trouvée dans les extraits d'un lysogène pour phage 13-29 induit avec IPTG, mais cela n'a pas été le cas pour les contrôles non induits. Cette protéine hybride a aussi été détectée par coloration au bleu de coomassie d'extraits fractionnés du SDS-PAGE correspondant (figure 4). Aucune protéine hybride n'a été détectée dans un lysogène pour phage le 13-36. Ces résultats concordent avec l'insert du clone 13-29 qui est intégré en phase avec la séquence codante de la beta-galactosidase et codant pour une chaîne polypeptidique de taille approximative de 60 kd compatible avec la taille de l'insert d'ADNc correspondant. L'isolement par criblage immunologique du clone 13-36 portant un insert orienté à l'opposé du gène de beta-galactosidase, et l'étude du lysogène correspondant, confirment la faible expression des séquences insérées sous le contrôle d'un autre promoteur de phage dans lambdaGT11, comme cela a été discuté par Lapeyre (1985) (Thèses Université de Toulouse, Ranguell, France). L'absence de détection de protéines hybrides dans les "western blots" d'extraits d'un lysogène du clone recombinant 13-36 peut être attribué au bas niveau d'expression de cette protéine hybride.

Les lysogènes ont été obtenus par infection de la souche RY1089 HFI par des phages recombinants. Des extraits bactériens ont été obtenus à partir de lysogènes induits ou non par IPTG comme décrit par Riva, 1985, Thèses PhD, Université Paris VI, France). Les extraits ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE, des expériences du "western blot" des protéines fractionnées sur nitrocellulose par électrotransfert, immunodétection avec l'antisérum alphaMNR et un deuxième antisérum de mouton dirigé contre les IgG de lapin couplé avec de la peroxydase (Cherel, 1985, Biochem. Biophys. Res. Comm., 129, 686-693).

EXEMPLE 9

CONFIRMATION DE L'IDENTITE DES ADNc CLONES PAR IMMUNOSELECTION DES ANTICORPS INHIBANT L'ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DE TABAC (figure 5)

Bien que l'antisérum alphaMNR utilisé pour le criblage ait semblé plutôt spécifique à l'égard de la NR de

tabac, l'antisérum peut avoir contenu une sous-classe mineure d'immunoglobuline reconnaissant d'autres protéines de tabac. Ceci pourrait conduire à l'isolement de "faux positifs". Pour tester cette possibilité, des cellules de la souche RY1090 d'E. coli ont été infectées par des phages lambdaGT11 et 13-29. Après induction par IPTG, les protéines synthétisées ont été transférées sur des filtres de nitrocellulose. Les anticorps de contrôle (alpha SO) et polyclonaux (alphaMNR) ont été mis en incubation avec les filtres et les immunoglobulines immunosélectionnées correspondantes ont été éluées des filtres à pH faible. Ces anticorps sélectionnés ont été ensuite analysés quant à leur faculté d'inhiber l'activité réductrice de nitrate de la NR de tabac. Comme on peut le voir figure 5, les protéines exprimées par le clone 13-29 ont pu se lier spécifiquement, dans le sérum alphaMNR, avec les anticorps inhibiteurs de la NR de tabac. Une inhibition à 40 % de l'activité de la NR de tabac a été obtenue avec une dilution à 1/200 des immunoglobulines sélectionnées, ce qui est raisonnablement en accord avec l'activité inhibitrice du sérum alphaMNR (70 % d'inhibition à dilution 1/200 pour le sérum). Ceci suggère également que la quantité de protéines hybrides disponibles pour l'immunosélection dépassait largement la quantité d'immunoglobulines absorbée dans le sérum. Il a été trouvé que, certainement, l'antisérum alphaMNR déjà utilisé pour la confirmation immunologique des clones positifs, était inapproprié pour le triage supplémentaire des nouveaux recombinants, probablement à cause d'une diminution de son titre en immunoglobulines dirigées contre la NR.

EXEMPLE 10

RECONNAISSANCE DE LA PROTEINE HYBRIDE EXPRIMEE PAR LE CLONE 13-29 PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA NITRATE REDUCTASE (tableau 1)

Trois anticorps monoclonaux de NR dressés contre la NR de tabac et maïs (tableau 1) ont été utilisés pour caractériser davantage les protéines hybrides. L'anticorps monoclonal 96(9)25 reconnaît la NR naturelle d'une variété de plantes et est inhibiteur de l'activité de l'enzyme. Les anticorps monoclonaux 7(113)NP15 et 24(48)NP19 reconnaissent la NR naturelle du tabac maïs n'ont pas d'incidence sur l'activité de l'enzyme. Pour contrôle, on a utilisé un anticorps monoclonal GET dirigé contre l'enveloppe glycosylée d'un coronavirus de porc. Les résultats sont reproduits au tableau 1. Parmi les quatre anticorps monoclonaux testés, les clones 96(9)25 et 24(48)NP19 ont reconnu spécifiquement les déterminants antigéniques d'un extrait d'un lysogène pour le clone 13-29, fabriqué dans la souche RY1089. Aucune reconnaissance significative n'a été détectée pour les clones 7(113)NP15 et GET. L'anticorps monoclonal 96(9)25 a une affinité supérieure pour la NR de tabac que l'anticorps monoclonal 24(48)NP19. La reconnaissance de la protéine hybride par ces deux anticorps monoclonaux suggère une situation semblable. Au moins deux épitopes différentes peuvent être détectées sur la protéine hybride qui sont ainsi reconnues sur la NR de tabac. L'absence de l'épitope reconnue par l'anticorps monoclonal 7(113)NP15 montre aussi, comme prévu, que la NR de tabac et la protéine hybride sont antigéniquement différentes, à cause de l'absence d'une partie de la séquence codante de la NR dans l'ADNc cloné.

La méthode d'immunosélection des anticorps reconnaissant les protéines hybrides exprimées par les recombinants est la suivante :

Des clones lambdaGT11 du type sauvage et recombinant ont été déposés sur la souche RY1090 dans des boîtes de 90 mm. Après lyse confluite en présence d'IPTG, les protéines des plages ont été transférées sur nitrocellulose. Deux transferts de nitrocellulose ont été saturés pendant 1 heure avec de la BSA 30 mg/ml et après lavage dans du PBS, ils ont été mis à incuber dans les antisérums (5 ml) alphaSo ou alphaMNR dilués à 1/100. Après incubation et lavage des filtres avec PBS, les anticorps adsorbés sur les filtres ont été élués par une incubation de 30 secondes dans 5 ml d'un tampon pH 2,2 de HCl-glycine 0,2 M. Après retrait du filtre, le tampon d'éluion a été rapidement neutralisé avec du Tris base et l'antisérum alphaSo non-immun a été ajouté dans un volume final de 10 ml à une dilution de 1/200 fois. Les protéines éluées ont été concentrées et dialysées contre PBS en utilisant une cellule Amicon équipée d'une membrane PM30. Différentes concentrations de ces échantillons ont été ajoutées à une préparation de NR de tabac purifiée, préparée par chromatographie d'affinité. Après 5 minutes d'incubation, l'activité de la NR a été analysée.

La méthode des mesures ELISA d'affinité des anticorps monoclonaux pour les protéines de fusion est la suivante :

L'isolement et la caractérisation de l'anticorps monoclonal 96(9)25 fixant le site actif de NR de différentes plantes ont déjà été décrites par Cherel (1985). Plusieurs anticorps monoclonaux reconnaissant l'enzyme du tabac ont été obtenus en utilisant une méthode semblable. La mesure ELISA d'affinité des anticorps monoclonaux pour les protéines de fusion a été réalisée en utilisant un test à deux sites selon la procédure décrite par Cherel (1986) (Plant. Physiol. 81, 376-378). Les réactifs ont été versés dans les plaques de microtitrage dans l'ordre suivant : anticorps monoclonal de fluide ascitique, extrait d'E. coli de lysogène, antisérum alphaMNR et IgG anti-lapin, conjugué d'alkaline phosphatase.

TABLEAU 1
MESURE ELISA DE L'AFFINITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX
DIRIGES CONTRE LA NR, POUR LES PROTEINES
HYBRIDES EXPRIMEES PAR LE CLONE 13-29

<u>Anticorps</u> <u>Monoclonal</u>	<u>Spécificité</u>	<u>Extraits bactériens testés apres induction IPTG</u>	
		<u>RY1089 (lambdaGT11)</u>	<u>RY1089 (13-29)</u>
96(9)25	NR de tabac et maïs naturelle	0,06	0,457
7(113)NP15	NR de tabac naturelle	0,019	0,004
24(48)NP19	NR de tabac naturelle	0,031	0,272
GET	Coronavirus de porc	0,003	0,057

EXEMPLE 11ANALYSES "NORTHERN" et "SOUTHERN BLOT" (Figures 6 et 7)1) Analyse de "Northern blot" d'ARNm s'hybridant avec le fragment EcoRI de 1,6 kb (figure 6)

Les ARN messagers ont été extraits de feuilles de tabac, de maïs et de *N. plumbaginifolia*, recueillies sur des plantes cultivées dans un milieu contenant du nitrate. Les "northern blot" des ARNm fractionnés sur des gels de formaldéhyde-agarose ont été sondés avec l'insert d'ADNc de 1,6 kb (figure 6). Un signal d'hybridation a été détecté après 3 jours d'exposition dans des préparations de tabac et *N. plumbaginifolia*. Aucun signal n'a été détecté, même après exposition prolongée dans le cas des ARNm de maïs. L'hybridation des mêmes taches avec une unité de répétition (motif) d'ADN de blé a montré que les ARNm homologues à l'insert de 1,6 kb avaient migré légèrement plus vite que l'ARN ribosomal de 28 s. Une taille de 3,5-3,6 kb était assignée aux ARNm quand les migrations étaient exécutées dans des gels de méthylmercurhydroxyde dans des conditions totalement dénaturées en présence de marqueurs de poids moléculaire d'ADN monobrin.

2) Analyse de "southern blot" des séquences génomiques homologues au fragment EcoRI de 1,6 kb (figure 7)

La complexité génomique des séquences homologues du fragment d'EcoRI de 1,6 kb a été étudiée en utilisant l'ADN extrait du tabac. Les résultats de "southern blot" effectuée dans des conditions stringentes sont présentés figure 7. Les signaux correspondant aux petits nombres de copies de séquences correspondantes ont été détectés dans les digestions comme le suggérait la comparaison avec les signaux d'hybridation obtenus en sondant avec un motif d'ADNr de blé. Quand l'ADN génomique était coupé par EcoRI, un signal était détecté dans les positions d'un fragment de 3,4 kb et un de 5 kb, et une hybridation faible était aussi observée correspondant à un fragment de 2,9 kb. Deux gènes de structure fonctionnels sont censés être présents dans le génome du tabac. Le fait que le fragment EcoRI de 1,6 kb soit interne à l'ADNc suggère que des séquences intervenant doivent être présentes dans la zone correspondante d'au moins un des deux gènes de structure.

3) Méthode d'expérimentation "northern et southern blot"

Les ARNm ont été fractionnés par électrophorèse dans des gels d'agarose 1,5 % d'hydroxyde de méthylmercure 10 mM pour le dosage précis des poids moléculaires ou dans des gels d'agarose 1,5 % formaldéhyde 3,0 % pour les expériences banales. Après fractionnement les ARNm ont été transférés sur des membranes Hybond C (Amersham) selon Thomas (1980) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201-5205).

L'ADN total a été extrait de jeunes feuilles de tabac selon le mode opératoire décrit par Dellaporta (1983)

(Plant. Mol. Biol. Reporter, 1, 19-21), purifié par centrifugation d'équilibre de gradient de CsCl, et utilisé pour l'analyse "southern blot" conformément à Deshayes (Embo. J. 4, 2731-2737 (1985)).

Les "northern et southern blots" ont été identifiés à l'aide de sondes comportant le fragment EcoRI de 1.6 kb d'un phage 13-29 purifié par centrifugation de gradient de saccharose ou avec le pTA71 marqué au phosphore 32 portant un insert d'ADNr de blé de 9 kb. L'hybridation a été effectuée dans du formamide 50 % à 45°C et lavé dans des conditions stringentes (3 lavages à température ambiante dans SDS 0,1 %, 2xSSC, suivis par 2 lavages de 30 minutes à 65°C dans SDS 0,1 % 0,2xSSC, selon Maniatis (1982) (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory).

10 EXEMPLE 12

SEQUENCE CODANTE PARTIELLE DES FIGURES 8 ET 9

La séquence nucléotidique des figures 8a et 8b provient du clone 13-29. Longue de 1662 bases, elle comprend les sites EcoRI, mais ne contient pas de séquences polyadénylées.

Parmi les six cadres de lecture possibles de la séquence, un seul se fait sans interruption par un cordon stop et code pour une chaîne polypeptidique de 554 acides aminés avec une masse moléculaire de 62,175 dalton. Ce cadre de lecture ouvert correspond à une fusion de traduction avec la séquence de la bêtagalactosidase du vecteur. Ce cadre de lecture représente environ 55 % de la taille de l'apoenzyme de nitrate réductase de tabac.

Comme présentés sur les figures 8 (a-b) et 9 (a-b), deux domaines d'homologie importante sont observés.

De la position 360 à 435, la nitrate réductase de tabac présente une homologie de séquence de 35 à 50 % avec les protéines de la superfamille du cytochrome b5, soit avec le cytochrome b5, le flavocytochrome b2 ou la sulfite oxydase selon Guiard et Lederer (1979a) (31). Le et Lederer (1983) (29) ont isolé par protéolyse à la chymotrypsine, le site d'attachement à l'hème de la nitrate réductase de *Neurospora crassa* et montré son homologie avec la famille du cytochrome b5.

Une homologie entre la séquence d'acides aminés de la nitrate réductase de tabac et le domaine d'attachement à l'hème de la nitrate réductase fongique est également observée comme on s'y attendait.

De la position 476 à 552, la séquence d'acides aminés de la nitrate réductase de tabac présentait une identité de 57 % avec la séquence N-terminale de la réductase de cytochrome b5 humaine (Yubisui et al. 1984) (27). Cette flavoenzyme FAD est connue pour former un transfert d'électrons à partir du NADH pour divers processus physiologiques d'oxydoréduction.

Comme l'ont montré Le et Lederer 1983 (29), le site d'attachement à l'hème de la nitrate réductase de *Neurospora crassa* est un membre de la superfamille du cytochrome b5. Nos résultats montrent que l'enzyme de tabac présente également une homologie significative avec différents membres de la superfamille. L'homologie du cytochrome b5 recouvre entièrement le domaine d'attachement à l'hème des diverses protéines. Cette séquence définit donc vraisemblablement le site d'attachement à l'hème de nitrate réductase de tabac.

Les treize acides aminés conservés de la superfamille (Lederer et al. 1985) (30) sont présents dans notre séquence de nitrate réductase de tabac qui apparaît plus proche du cytochrome b5 de poulet que des autres membres de la superfamille (figures 9 a-b).

La relative différence existant entre les nitrates réductases de plantes et de champignons tend à indiquer une évolution dissemblable pour cette enzyme.

Une homologie significative de la séquence codante de l'ADNc cloné avec la réductase cytochrome b5 flavoprotéine humaine a aussi été détectée. Cette protéine est connue pour catalyser la réduction du cytochrome b5 utilisant NADH comme donneur d'électrons et FAD comme intermédiaire d'oxydoréduction. Ceci peut être comparé fonctionnellement à la réaction catalytique de réduction des nitrates mettant en oeuvre NADH, FAD et le cytochrome b5 comme cofacteurs. Ceci suggère que cette seconde séquence homologue est le fragment N-terminal du site NADH/FAD de nitrate réductase de tabac.

50 EXEMPLE 13

SEQUENCE CODANTE COMPLETE DE LA NITRATE REDUCTASE DE TABAC

La séquence de nucléotides de la nitrate réductase de tabac a été obtenue comme suit.

L'insert d'ADNc du phage recombinant λ 13-29, dont la séquence a été décrite ci-dessus, a été utilisé pour cribler des bibliothèques génomiques de tabac faites dans les phages EMBL 3B et EMBL 4. Un phage 3.12 portant les séquences homologues de l'ADNc a ensuite été caractérisé. L'insert de ce phage a été sous-cloné dans pUC 9 et des fragments clonés ont été utilisés pour des expériences d'hybridation de northern blot. L'ADNc partiel a été purifié à partir de la bibliothèque d'ADNc en utilisant des fragments génomiques s'hybridant avec de l'ARNm de nitrate réductase comme sondes. Les séquences des fragments génomiques et les clones d'ADNc ont été réalisées en double brins en utilisant la méthode au didéoxy de Sanger. Les séquences de nucléotides et les séquences d'acides aminés de la nitrate réductase de tabac, qui apparaissent à la figure 10, ont été déduites à partir de l'analyse des données de séquences et numérotées à partir du codon start ATG.

65

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BANTLE J.A., MAXWELL I.H. et HAHN W.E. (1978) *Anal. Biochem.* 70, 75-85.
- (2) CAMPBELL W.H. et SMARELLI J. (1983) *Phytochem* 225, 2375-2382.
- (3) CHEREL I., GROSCLAUDE J. et ROUZE P. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 129, 686-693.
- (4) CHEREL I., MARION-POLL. A., MEYER C. et ROUZE P. (1986) *Plant Physiol.*, 81, 376-378. 5
- (5) CHIRGWIN J.M., PRZYBYLA A.E., MacDONALD R.J. et RUTTER W.J. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- (6) COMMERE B., CHEREL I., KRONENBERGER J., GALANGAU F. et CABOCHE M. (1986), *Plant Sci.*, 44, 191-203.
- (7) DELLAPORTA S.L., WOOD J. et HICKS J.B. (1983) *Plant Mol. Biol. Reporter*, 1, 19-21. 10
- (8) DESHAYES A., HERRERA ESTRELLA L. et CABOCHE M. (1985) *EMBO J.*, 4, 2731-2737
- (9) GERLACH W.L. et BEDBROOK J. (1979) *Nucleic Acid Res.*, 7, 1869-1885.
- (10) GUBLER U. et HOFFMANN B.J. (1983) *Gene*, 25, 263-269.
- (11) HOWARD W.D. et SOLOMONSON L.P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10243-10250.
- (12) HEWITT E.J. (1975) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26, 73-100. 15
- (13) HUYNH T.V., YOUNG R.A. et DAVIS R.W. (1984) in Glover, D. (Eds) *DNACloning techniques: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- (14) KLEINHOF A., WARNER R.L. et NARAYANAN K.R. (1985) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 2, 91-121.
- (15) LAPEYRE B. (1985) PhD Thesis Université de Toulouse. Ranguelil. France. 20
- (16) MANIATIS T., FRITSCH E.F. et SAMBROOK J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- (17) MILLER J.H. (1982) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (18) RASUL CHAUHRY G. et MacGREGOR C.H. (1983) *J. BACTERIOL.*, 154, 387-394.
- (19) REDINBAUGH M.G. et CAMPBELL W.H. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 3380-3385. 25
- (20) REDINBAUGH M.G. et CAMPBELL W.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 114, 1182-1188.
- (21) RIVA M. (1985) PhD Thesis, Université Paris VI, France.
- (22) THOMAS S.P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5201-5205.
- (23) VIEIRA J. et MESSING J. (1982) *Gene*, 19, 259-268.
- (24) YOUNG R.A. et DAVIS R.W. (1983) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80, 1194-1198. 30
- (25) LEDERER F., GHRIR R., GUIARD B., CORTIALS S., ITO A. (1983) Two homologous cytochromes b5 in a single cell. *Eur. J. Biochem.* 132 : 95-102
- (26) OZOLS J., HEINEMANN F.S. (1982) Chemical structure of rat liver cytochrome b5. Isolation of peptides by high-pressure liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 704 : 163-173
- (27) OZOLS J., GERARD C., NOBREGA F. (1976) Proteolytic cleavage of horse liver cytochrome b5. Primary structure of the heme-containing moiety. *J. Biol. Chem.* 251 : 6767-6774 35
- (28) NOBREGA F.G., OZOLS J. (1971) Amino acid sequences of tryptic peptides of cytochrome b5 from microsomes of human, monkey, porcine and chicken liver. *J. Biol. Chem.* 246 : 1706-1717
- (29) LÊ KHD, LEDERER F., (1983) On the presence of a heme-binding domain homologous to cytochrome b5 in *Neurospora crassa* assimilatory nitrate reductase. *EMBO J.* 2 : 1909-1914 40
- (30) LEDERER F., CORTIALS S., BECAM A-M., HAUMONT P.Y., FERREZ L. (1985) Complete amino acid sequence of flavocytochrome b2 from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* 152 : 419-423
- (31) GUIARD B., LEDERER F. (1979) Amino acid sequence of the b5-like heme-binding domain from chicken sulfite oxidase. *Eur. J. Biochem.* 100 : 441-453 45

Revendications

- 1) Vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac. 50
- 2) Vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac comportant sur un fragment EcoRI/EcoRI de cet ADNc, dans l'ordre, les sites suivants : XmnI, HindIII, KpnI, EcoRI. 55
- 3) Vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac comportant sur un fragment EcoRI/EcoRI de cet ADNc, dans l'ordre, les sites suivants : KpnI, HindIII, XmnI, EcoRI.
- 4) Vecteur de clonage selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'ADNc est inséré dans un phage. 60
- 5) Vecteur de clonage selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'insert d'ADNc est d'au moins 1,6 kb.
- 6) Vecteur de clonage selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'insert d'ADNc code pour plus de 50 % de l'ARNm de la nitrate réductase de tabac.
- 7) Vecteur de clonage comportant un ADN complémentaire de l'ARNm de la nitrate réductase de 65

tabac, selon l'une des revendications 1 à 6, comprenant la séquence codante de nucléotides suivante :

5
 10
 15
 20

GAA TTC CCT TGT AGA GAA TTG CCC GTT ACG CTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA AGG AAA GAA CAG
 AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GCC GCC GCT GCC GTT TCA AGA ACC ATA TGG
 CGC GCG GTA CCC CTC GCG GCT TTG GTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG
 CTT AAT GTT TGC TTC GAA GGA CCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT GGT GGT TCA AAG TAT GGA ACC
 AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA ATG GAT CCA GCA CGA GAT ATC ATC GTA GCC TAC ATG CAG AAC
 GGA GAA AAA TTG CCA CCC GAC CAC GGG TTT CCA GTA CGA ATG ATA ATT CGA GGA TTC ATT CGA
 GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA AAG AGG ATT ATA GTC ACC ACC CAA GAA TCA GAC AGC TAT TAT
 CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT GAA GTT GCA AAT ACC GAA GCA
 TGG TGG TAC AAG CCA CAG TAT ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT GTC ATT ACC AGC CCG
 TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC TGG ACG ACT CAG CGA CCT TAC AGG TTG AGG GCG
 TAT TCT TAT TCT GGC GGA GCG AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA GGA GAA
 ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC ACC AAA TAT GCG AAG TAC TGG TGT
 TGG TGC TTT TGG TCA CTC GAG GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT

25
 30
 35
 40

CGA GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT ATT TGG AAC GTC ATG GGA ATG
 ATG AAT AAT TGC TGG TTC CGA GTA AAG ATG AAT GTG TGG AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA
 ATA GTG TTT GAG CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAG CAA TCA GGT GGA TGG ATG GCG AAG GAG AGA
 CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG GCA CCT CAA ACA CTA AAG AAG AGT ATG TCA ACT CCA TTC ATG
 AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC TCC ATG TCC GAG GTC AGG AAA CAG AGC TGT GGT GAC TCT GGT
 TGG ATC ATA GTC CAT GGT CAT ATC TAT GAC GCC ACG GGT TTC TTG AAA GAT GAC CCT GGT GCG
 ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GCC ACT GAT TGC ACT GAG GAA TTT GAT GCA ATT CAT TCT
 CAT AAG GCT AAG AAG CTC TTG GAG GAT TTC ACG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT TAC ACC
 TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GCA TCT TCT TCC TTC ACC AGC TTT GTA GCA CCT ATT
 AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA
 CTC ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT CGA TTT GCA TTG CCC TCT GAG
 GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT GTT GGA AAA CAT ATC TTC CTC TGT GCG GTT ATT CAC GAT AAG
 CTC TGC ATG CCG GCT TAC ACG CCT AGT AGC ACG ATC GAT CAG GTG GCG TAC TTC GAG TTG GTT
 GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA ATT

45
 50
 55
 60
 65

8) Vecteur de clonage selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence codante de nucléotides complète suivante :

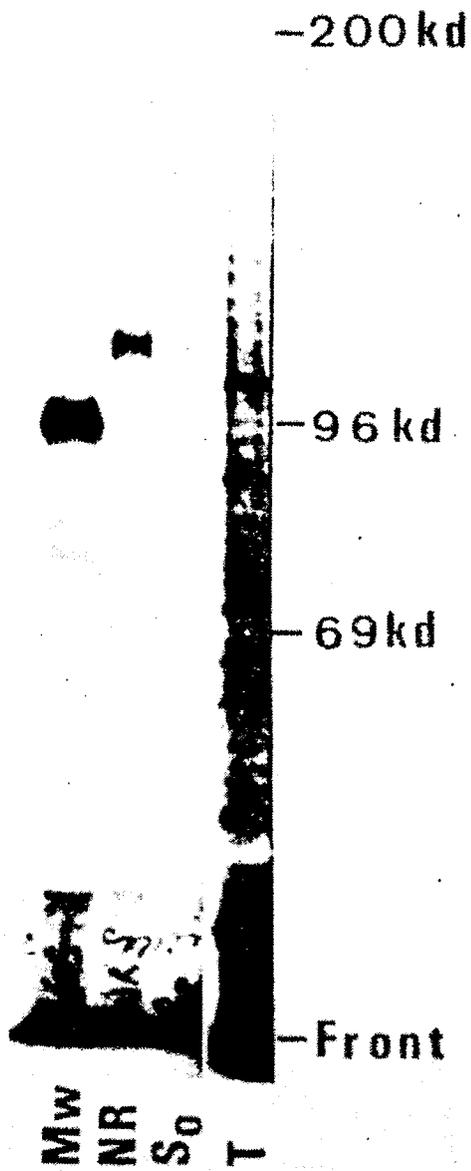
ATG GCG GCA TCT GTC GAA AAC AGG CAG
TTC AGT CAC CTA GAA GCC GGT TTA TCC CGG TCT TTC AAG CCC
CGG TCT GAT TCC CCG GTT CGT GGC TGC AAC TTC CCT TCG CCC
AAC AGT ACT AAT TTC CAA AAG AAA CCA AAT TCC ACC ATT TAC
CTT GAT TAC TCG TCG AGT GAA GAC GAC GAT GAT GAT GAC GAA
AAA AAT GAG TAC CTT CAA ATG ATT AAA AAA GGG AAT TCA GAG
TTA GAG CCA TCT GTT CAT GAC ACT AGG GAC GAA GGT ACC GCT
GAT AAT TGG ATT GAA CGC AAC TTT TCC ATG ATT CGT CTC ACC
GGA AAG CAT CCA TTT AAC TCC GAA CCA CCG TTG AAC CGG CTC
ATG CAC CAC GGC TTT ATC ACA CCG GTC CCA CTT CAT TAC GTT
CGT AAC CAT GGA CCG GTT CCC AAG GGC ACG TGG GAT GAC TGG
ACC GTG GAA GTC ACG GGA CTA GTG AAG CGT CCT ATG AAA TTC
ACA ATG GAC CAG TTG GTT AAC GAA TTC CCT TGT AGA GAA TTG
CCC GTT ACG CTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA AGG AAA GAA CAG
AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GGC GCC GCT

GCC GTT TCA ACA ACG ATA TGG CGC GGG GTA CCC CTC CGC GCT
 TTG CTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG
 CTT AAT GTT TGC TTC GAA GGA GCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT
 GGT GGT TCA AAG TAT GGA ACC AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA
 ATG GAT CCA GCA CGA GAT ATC ATC GTA GCC TAC ATG CAG AAC
 GGA GAA AAA TTG GCA CCC GAC CAC GGG TTT CCA GTA CGA ATG
 ATA ATT CCA GGA TTC ATT GGA GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA
 AAG AGG ATT ATA GTC ACC ACC CAA GAA TCA GAC AGC TAT TAT
 CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT
 GAA CTT GCA AAT ACC GAA GCA TGG TGG TAC AAG CCA GAG TAT
 ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT GTC ATT ACG ACG CCG
 TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC TGG ACG ACT CAG
 CGA CCT TAC ACG TTG AGG GGC TAT TCT TAT TCT GGC GGA GGG
 AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA GGA GAA
 ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC ACC
 AAA TAT GGC AAG TAC TGG TGT TGG TGC TTT TGG TCA CTC GAG
 GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT
 CGA GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT
 ATT TGG AAC GTC ATG GGA ATG ATG AAT AAT TGC TGG TTC CGA
 GTA AAG ATG AAT GTG TGC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA
 ATA GTG TTT GAG CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAC CAA TCA GGT
 GGA TGG ATG GCG AAG GAG AGA CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG
 GCA CCT CAA ACA CTA AAG AAG AGT ATC TCA ACT CCA TTC ATG
 AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC TCC ATG TCC GAG GTC AGG AAA
 CAC AGC TCT GCT GAC TCT GCT TGG ATC ATA GTC CAT GGT CAT
 ATC TAT GAC GCC ACG CGT TTC TTG AAA GAT CAC CCT GGT GGG
 ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GGC ACT GAT TGC ACT GAG
 GAA TTT GAT GCA ATT CAT TCT GAT AAG GCT AAG AAG CTC TTG
 GAG GAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT TAC ACC
 TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GGA TCT TCT TCC TTC
 AGC AGC TTT CTA GCA CCT ATT AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG
 AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA

CTC ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT
CGA TTT GCA TTG CCC TCT GAG GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT
GTT GGA AAA CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC GAT AAG
CTC TGC ATG CGC GCT TAC ACG CCT ACT AGC ACG ATC GAT GAG
GTG GGG TAC TTC GAG TTG GTT GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA
ATT CAC CCT AAA TTC CCC AAT GGA GGG CAA ATG TCA CAG TAT
CTT GAT TCT ATG CCG TTA GGG TCA TTT CTC GAC GTG AAA GGT
CCA TTA GGT CAC ATT GAA TAC CAA GGA AAG GGA AAT TTC TTA
GTT CAT GGC AAA CAG AAG TTT GCC AAG AAG TTG GCC ATG ATA
GCA GGT GGA ACA GGA ATA ACT CCA GTG TAT CAA GTC ATG CAG
GCA ATT CTG AAA GAT CCA GAA GAT GAC ACA GAA ATG TAT GTG
GTG TAT GCT AAC AGA ACA GAG GAT GAT ATT TTA CTT AAG GAA
GAG CTT GAT TCA TGG GCT GAG AAA ATT CCA GAG AGG GTT AAA
GTT TGG TAT GTG GTT CAG GAT TCT ATT AAA GAA GGA TGG AAG
TAC AGC ATT GGT TTT ATT ACA GAA GCC ATT TTG AGA GAA CAT
ATC CCT GAG CCA TCT CAC ACA ACA CTG GCT TTG GCT TGT GGA
CCA CCT CCT ATG ATT CAA TTT GCT GTT AAT CCA AAC TTG GAG
AAG ATG GGC TAT GAC ATT AAG GAT TCC TTA TTG GTG TTC TAA

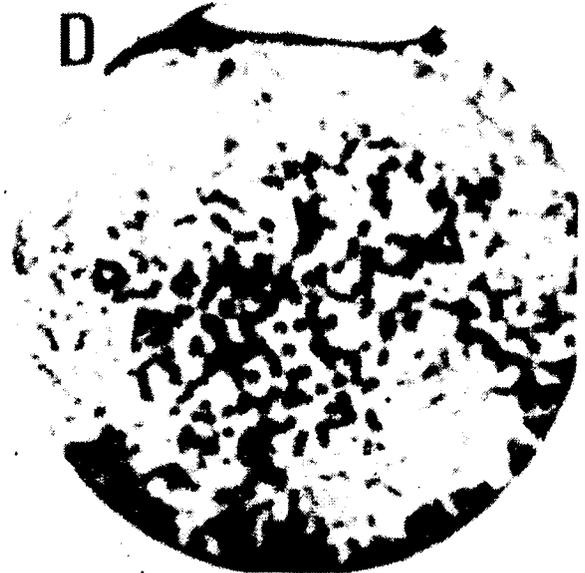
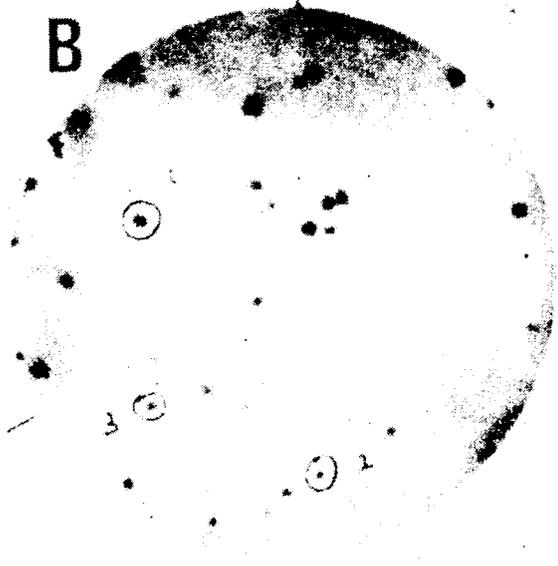
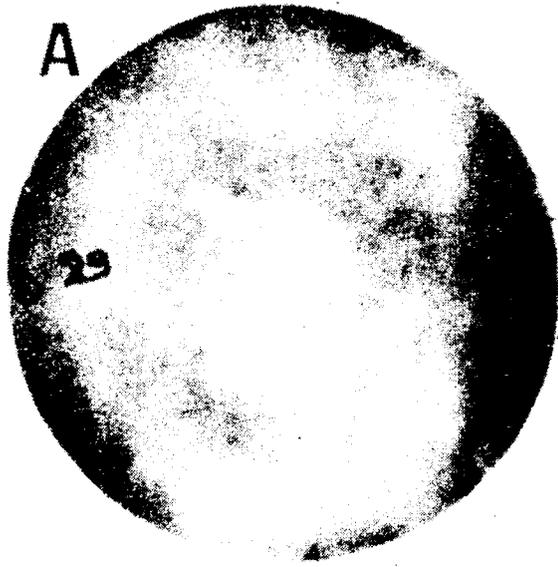
0283338

1 2 3 4



FIG_1

0283338



FIG_2

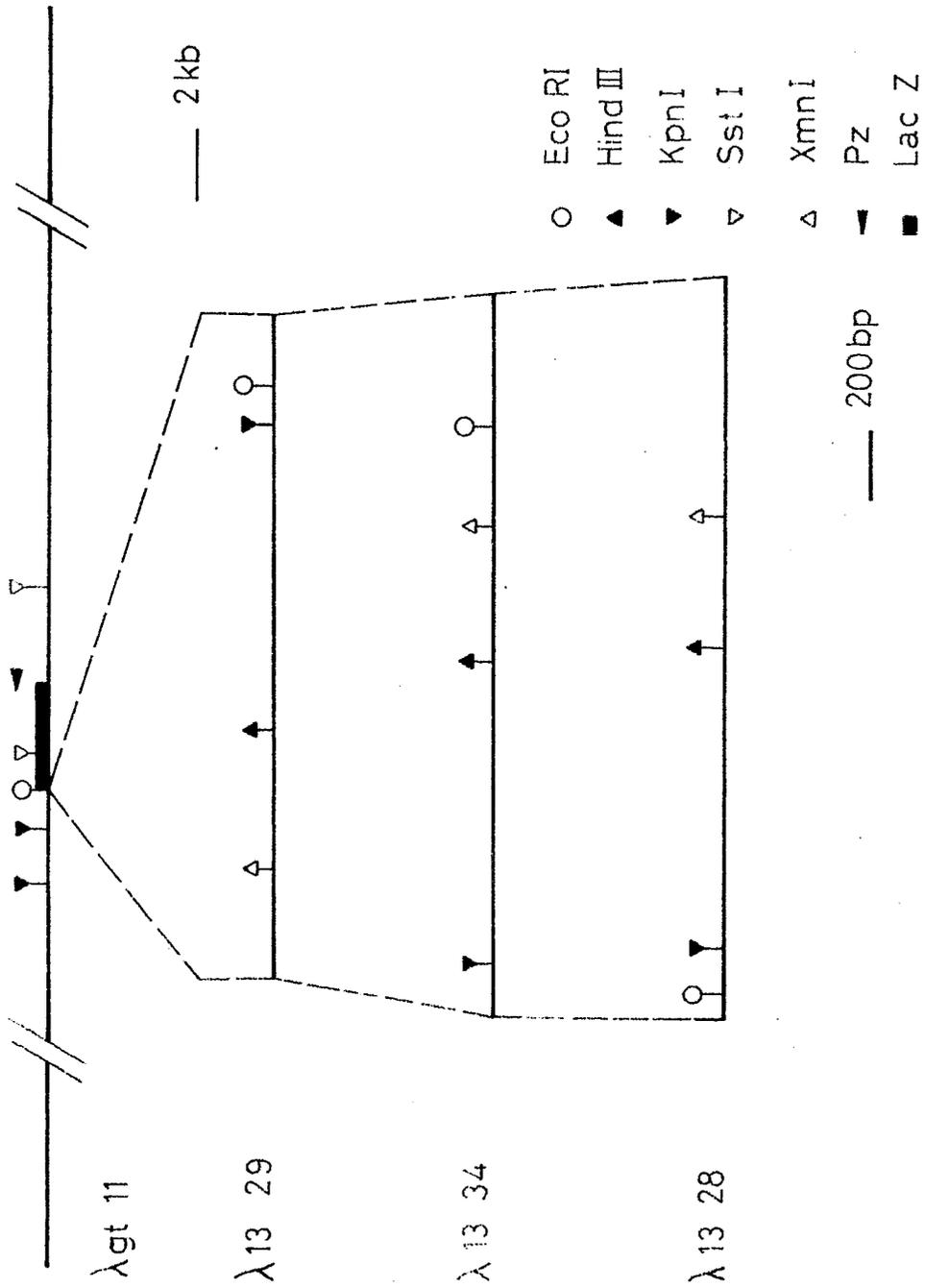
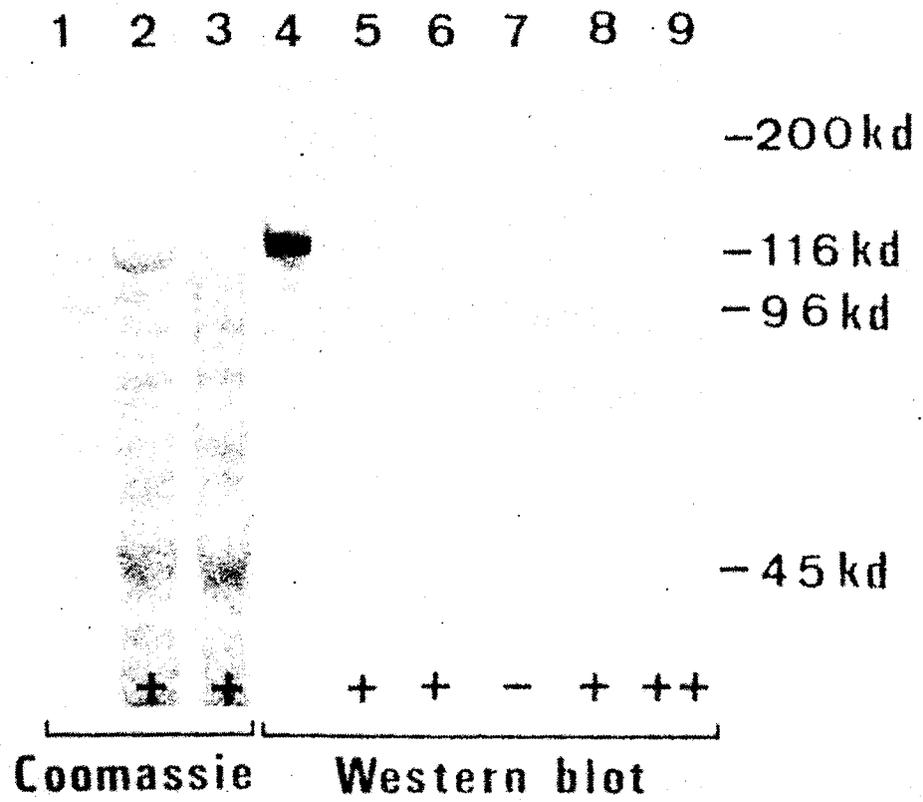


FIG-3

110488

0283338



FIG_4

110400

0283336

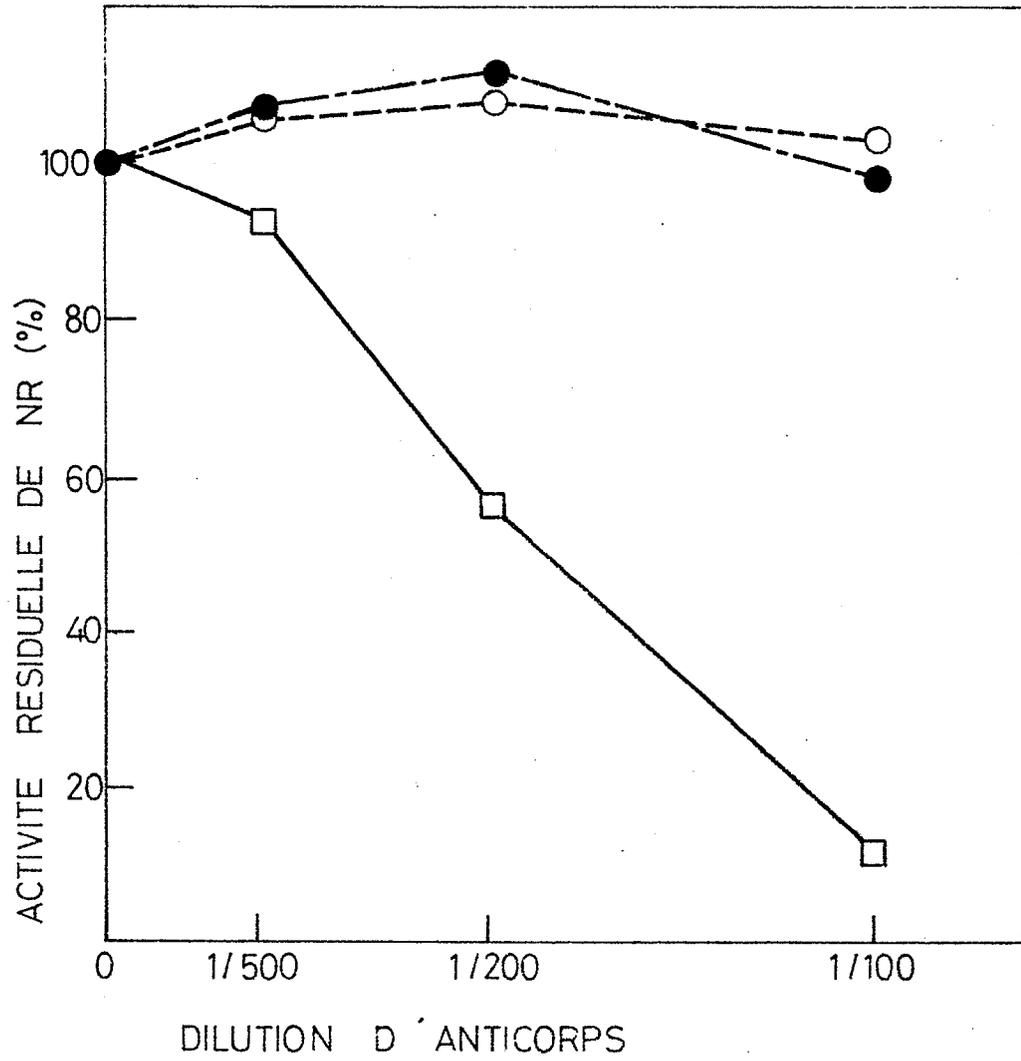
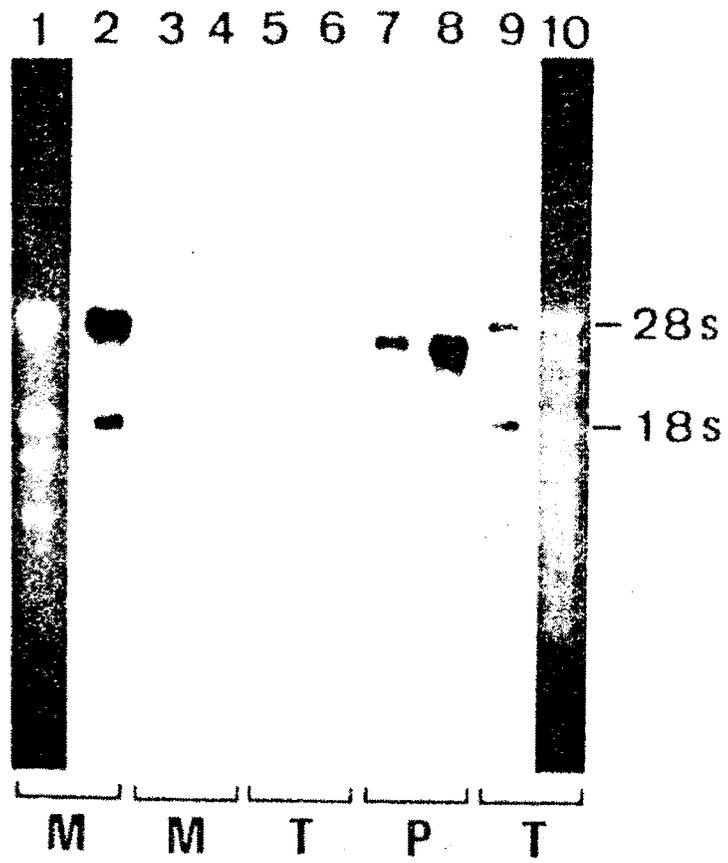


FIG-5



FIG_6

110400

0283338

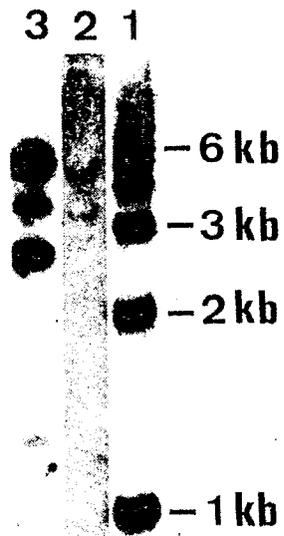


FIG.7

atcggc GAA TTC CCT TGT ACA GAA TTC CCC GTT ACC GTT TGT GCT GCC AAT CGA AGC AAA CAA CAG AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT 90
 Glu Phe Pro Cys Arg Glu Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys Glu Gln Asn Met Val Lys Gln Thr Ile 28

 CCT TTC AAC TCG CCC GCT CCC GTT TCA ACA ACC ATA TCG CGC GCG GTA CCC CTC CCC GCT TTG CTA AAA CCG TCG GGT GTT TTT AGC 180
 Gly Phe Asn Trp Gly Ala Ala Val Ser Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Lys Arg Cys Gly Val Phe Ser 58

 AAG AAT AAA CCG CCG CTT AAT CTT TGC TTC GAA GGA GCT CAT GTG TTG CCC GGA CCT GGT TCA AAG TAT GGA ACC AGC ATT AAG AAG 270
 Lys Asn Lys Gly Ala Leu Asn Val Cys Phe Glu Gly Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile Lys Lys 88

 GAA TTT GCA ATG GAT CCA GCA GAT ATC ATC GTC ACC AAC GGA GAA AAA TTG GCA CCC GAC CAC GCG TTT CCA GTA CGA 360
 Glu Phe Ala Met Asp Pro Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg 118

 ATG ATA ATT CCA GGA TTC ATT GCA GGA AGA ATG GTC AAA TGG ATA AAG AGC ATT ATA GTC ACC ACC CAA GAA TCA GAC ACC TAT TAT CAT 450
 Met Ile Ile Pro Gly Phe Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys Arg Ile Ile Val Thr Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His 148

 TTC AAG GAC AAT AGA GTT CTT CCT CCC CAT GTT GAT GAA CTT CCA AAT ACC GAA GCA TGG TCG TAC AAG CCA GAG TAT ATC ATC AAT 540
 Phe Lys Asp Asn Arg Val Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr Glu Ala Trp Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn 178

 GAG CTT AAT ATT AAG TCT GTC ATT ACC CCG TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC CCC TGG ACC ACT CAG CGA CCT TAC ACC TTG 630
 Glu Leu Asn Ile Asn Ser Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn Ala Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu 208

 ACG GGC TAT TCT TAT TCT GGC GCA GGG AAA AAA GTA ACC CCA GTA GAA GTG ACC TTG GAT GGA GGA CAA ACA TGG CAA GTT ACC ACA CTA 720
 Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu 238

 GAT CAC CCA CAG AAG CCC ACC AAA TAT GCC AAG TAC TCG TGT TCG TTT TGG TCA CTC CAG GTT CAG GTG TTA CAC TTG CAC AGT GCT 810
 Asp His Pro Glu Lys Pro Thr Lys Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu Val Glu Val Leu Asp Leu Leu Ser Ala 268

 AAA CAA ATT GCT GTT CCA CCT TGG GAT CAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT ATT TCG AAC CTC ATG CCA ATG ATG AAT TCC 900
 Lys Glu Ile Ala Val Arg Ala Trp Asp Glu Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp Asn Val Met Gly Met Met Asn Asn Cys 298

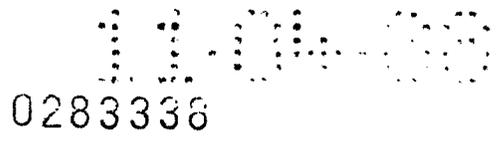


FIG. 8a

TGG TTC CGA GTA AAG ATG AAT GTG TCC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA ATA GTG TTT GAG CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAG CAA TCA 990
 Trp Phe Arg Val Lys Met Asn Val Cys Lys Pro His Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu His Pro Thr Gln Pro Gly Asn Gln Ser 328

 GGT GGA TCG ATG GCG AAG GAG AGA CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG GCA CCT CAA ACA CTA AAG AAG ACT ATC TCA ACT CCA TTC ATG AAG 1080
 Gly Gly Trp Met Ala Lys Lys Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met Asn 358

 ACA CCT TCC AAG ATG TAC TCC ATG TCC GAG CTC ACC AAA CAC ACC TCT GCT GAG TCT GCT TGG ATC ATA GTC CAT GGT CAT ATC TAT GAC 1170
 Thr Ala Ser Lys Met Tyr Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser Ala Asp Ser Ala Trp Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp 388

 GCC ACC CCT TTC TTG AAA CAT CAC CCT GGT GCG ACT GAC ACC ATT CTC ATC AAT CCT GCC ACT GAT TGG ACT GAG GAA TTT GAT GCA ATT 1260
 Ala Thr Arg Phe Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn Ala Gly Thr Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile 418

 CAT TCT CAT AAG CCT AAG AAG CTC TTG GAG CAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT TAC ACC TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC 1350
 His Ser Asp Lys Ala Lys Lys Leu Leu Gln Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser 468

 CTC CAC GCA TCT TCT TCC ACC ACC TTT CTA GCA CCT ATT AAG CAA CTT GTT CCA GCG CAG ACC AGT GTC GGC CTA ATT CCA AGA GAG 1440
 Val His Gly Ser Ser Ser Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln Arg Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu 478

 AAA ATC CCA TGC AAA CTC ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGC AAA TTT CGA TTT GCA TTG CCC TCT GAG GAT CAA CTC TTC 1530
 Lys Ile Pro Cys Lys Leu Ile Asp Lys Lys Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe Ala Leu Pro Ser Glu Asp Gln Val Leu 508

 GCC TTG CCT GTT GCA AAA CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC CAT AAG CTC TGC ACC GCT TAC ACC CCT ACT AGC AGG ATC CAT 1620
 Gly Leu Pro Val Gly Lys His Ile Phe Leu Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg Ala Tyr Thr Pro Thr Ser Thr Ile Asp 518

 GAG GTC GCG TAC TTC GAG TTG GAT GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA ATT CCA 1671
 Glu Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Val Lys Ile Tyr Phe Lys Gly Ile 554

02083333

FIG-8b

0283336

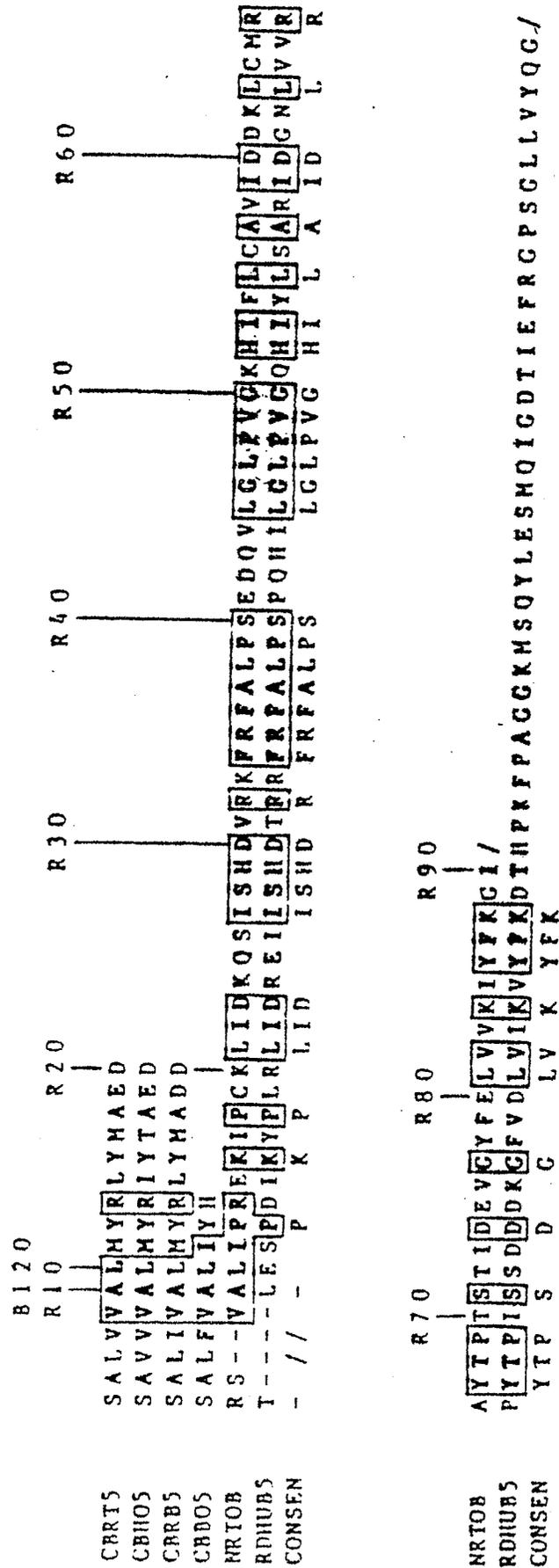
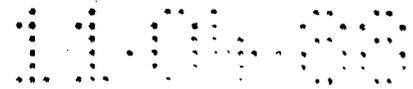


FIG. 9B



0283338

MetAlaAlaSerValGluAsnArgGlnPheSerHisLeuGluAlaGlyLeuSerArgSerPheLysProArgSer
 ATGGCGGCATCTGTGCGAAAACAGGCAGTTTCAGTCACCTAGAAAGCCGGTTTATCCGGTCTTTCAAGCCCCGGTCT
 1 11 21 31 41 51 61
 AspSerProValArgGlyCysAsnPheProSerProAsnSerThrAsnPheGlnLysLysProAsnSerThrIle
 GATTCCCCGGTTTCGTGGCTGCAACTTCCCTTCGCCCAACAGTACTAATTTCCAAAAGAAACCAAATTCCACCATT
 76 86 96 106 116 126 136
 TyrLeuAspTyrSerSerSerGluAspAspAspAspAspGluLysAsnGluTyrLeuGlnMetIleLysLys
 TACCTTGATTACTCGTCGAGTGAAGACGACGATGATGATGACGAAAAAATGAGTACCTCAAATGATTAATAAAAA
 151 161 171 181 191 201 211
 GlyAsnSerGluLeuGluProSerValHisAspThrArgAspGluGlyThrAlaAspAsnTrpIleGluArgAsn
 GGAATTCAGAGTTAGAGCCATCTGTTTCATGACACTAGGGACGAAGGTACCGCTGATAATTGGATTGAACGCAAC
 226 236 246 256 266 276 286
 PheSerMetIleArgLeuThrGlyLysHisProPheAsnSerGluProProLeuAsnArgLeuMetHisHisGly
 TTTTCCATGATTCGTCTCACCGGAAAGCATCCATTTAACTCCGAACCCCGTTGAACCGGCTCATGACCACGGC
 301 311 321 331 341 351 361
 PheIleThrProValProLeuHisTyrValArgAsnHisGlyProValProLysGlyThrTrpAspAspTrpThr
 TTTATCACACCGGTCCCACTTCACTTACGTTTCGTAACCATGGACCGGTTCCCAAGGGCACGTGGGATGACTGGACC
 376 386 396 406 416 426 436
 ValGluValThrGlyLeuValLysArgProMetLysPheThrMetAspGlnLeuValAsnGluPheProCysArg
 GTGGAAGTCACGGGACTAGTGAAGCGTCCATGAAATTCACAATGGACCAGTTGGTTAACGAATTCCTTGTAGA
 451 461 471 481 491 501 511
 GluLeuProValThrLeuValCysAlaGlyAsnArgArgLysGluGlnAsnMetValLysGlnThrIleGlyPhe
 GAATTGCCCGTTACGCTTGTGTTGTGCTGGCAATCGAAGGAAAGAACAGAACATGGTTAAACAAACCATTGGTTTC
 526 536 546 556 566 576 586
 AsnTrpGlyAlaAlaAlaValSerThrThrIleTrpArgGlyValProLeuArgAlaLeuLeuLysArgCysGly
 AACTGGGGCCCGCTGCGGTTTCAACAACGATATGGCGGGGTACCCGCTCCGCGCTTGTCTAAAACGGTGGCGT
 601 611 621 631 641 651 661
 ValPheSerLysAsnLysGlyAlaLeuAsnValCysPheGluGlyAlaAspValLeuProGlyGlyGlyGlySer
 GTTTTTAGCAAGAATAAAGGGGGCGCTTAATGTTTGTCTCGAAGGAGCTGATGTGTTSCCGGAGGTGGTGGTCA
 676 686 696 706 716 726 736
 LysTyrGlyThrSerIleLysLysGluPheAlaMetAspProAlaArgAspIleIleValAlaTyrMetGlnAsn
 AAGTATGGAACCAGCATTAAAGAAGGAATTTGCAATGGATCCAGCAGGATATCATCGTAGCCTACATGCAGAAC
 751 761 771 781 791 801 811
 GlyGluLysLeuAlaProAspHisGlyPheProValArgMetIleIleProGlyPheIleGlyGlyArgMetVal
 GGAGAAAAATGGCACCCGACCACGGGTTTCCAGTACGAATGATAATTCCAGGATTCAATGGAGGAAGAATGGTG
 826 836 846 856 866 876 886
 LysTrpIleLysArgIleIleValThrThrGlnGluSerAspSerTyrTyrHisPheLysAspAsnArgValLeu
 AAATGGATAAAGAGGATTATAGTCACCACCCAAGAATCAGACAGCTATTATCATTTCAAGGACAATAGAGTTCTT
 901 911 921 931 941 951 961
 ProProHisValAspAlaGluLeuAlaAsnThrGluAlaTrpTrpTyrLysProGluTyrIleIleAsnGluLeu
 CCTCCCATGTTGATGCTGAACTTGCAAATACCGAAGCATGGTGGTACAAGCCAGAGTATATCATCAATGAGCTT
 976 986 996 1006 1016 1026 1036
 AsnIleAsnSerValIleThrThrProCysHisGluGluIleLeuProIleAsnAlaTrpThrThrGlnArgPro
 AATATTAACCTGTGCATTACGACGCCGTGTCATGAAGAAATTTGGCAATTAACGGCTGGACGACTCAGCGACCT
 1051 1061 1071 1081 1091 1101 1111
 TyrThrLeuArgGlyTyrSerTyrSerGlyGlyGlyLysLysValThrArgValGluValThrLeuAspGlyGly
 TACACGTTGAGGGGCTATTCTTATTCTGGCGGAGGGAAAAAGTAACGGGAGTAGAAGTGACGTTGGATGGAGGA
 1126 1136 1146 1156 1166 1176 1186
 GluThrTrpGlnValSerThrLeuAspHisProGluLysProThrLysTyrGlyLysTyrTrpCysTrpCysPhe
 GAAACATGGCAAGTTAGCACACTAGATCACCCAGAGAAGCCGACCAATATGGCAAGTACTGGTGGTGGTGGCTT
 1201 1211 1221 1231 1241 1251 1261
 TrpSerLeuGluValGluValLeuAspLeuLeuSerAlaLysGluIleAlaValArgAlaTrpAspGluThrLeu
 TGGTCACTCGAGGTTGAGGTGTTAGACTTGCTCAGTGCTAAAGAAATTTGCTGTTCCGAGCTTGGGATGAGACCCCTC
 1276 1286 1296 1306 1316 1326 1336
 AsnThrGlnProGluLysLeuIleTrpAsnValMetGlyMetMetAsnAsnCysTrpPheArgValLysMetAsn
 AATACTCAACCCGAGAAGCTTATTTGGAACGTCATGGGAATGATGAATAATTGCTGGTCCGAGTAAAGATGAAT
 1351 1361 1371 1381 1391 1401 1411
 ValCysLysProHisLysGlyGluIleGlyIleValPheGluHisProThrGlnProGlyAsnGlnSerGlyGly
 GTGTCAAGCCTACAAGGGAGAGATTGGAATAGTGTGTTGAGCATCGGACTCAACCTGGAACCAATCAGGTGGA
 1426 1436 1446 1456 1466 1476 1486

FIG_10

0283338

TrpMetAlaLysGluArgHisLeuGluIleSerAlaGluAlaProGlnThrLeuLysLysSerIleSerThrPro
TGGATGGCGAAGGAGAGACATTTGGAGATATCAGCAGAGGCACCTCAAACACTAAAGAAGAGTATCTCAACTCCA
1501 1511 1521 1531 1541 1551 1561
PheMetAsnThrAlaSerLysMetTyrSerMetSerGluValArgLysHisSerSerAlaAspSerAlaTrpIle
TTCATGAACACAGCTTCCAAGATGTACTCCATGTCCGAGGTCCAGAAACACAGCTCTGCTGACTCTGGCTTGGATC
1576 1586 1596 1606 1616 1626 1636
IleValHisGlyHisIleTyrAspAlaThrArgPheLeuLysAspHisProGlyGlyThrAspSerIleLeuIle
ATAGTCCATGGTCATATCTATGACGCCACGGTTTTCTTGAAGATCACCCCTGGTGGGACTGACAGCATTCTCATC
1651 1661 1671 1681 1691 1701 1711
AsnAlaGlyThrAspCysThrGluGluPheAspAlaIleHisSerAspLysAlaLysLysLeuLeuGluAspPhe
AATGCTGGCACTGATTGCACTGAGGAATTTGATGCAATTCATTCTGATAAGGCTAAGAAGCTCTTGGAGGATTC
1726 1736 1746 1756 1766 1776 1786
ArgIleGlyGluLeuIleThrThrGlyTyrThrSerAspSerProGlyAsnSerValHisGlySerSerSerP.e
AGGATTGGTGAACCTATAACTACTGGTTACACCTCTGACTCTCTGGCAACTCCGTGCACGGATCTTCTTCCTC
1801 1811 1821 1831 1841 1851 1861
SerSerPheLeuAlaProIleLysGluLeuValProAlaGlnArgSerValAlaLeuIleProArgGluLysIle
AGCAGCTTTCTAGCACCTATAAGGAAGTTGTTCCAGCGCAGAGGAGTGTGGCCCTAATTCCAAGAGAGAAAATC
1876 1886 1896 1906 1916 1926 1936
ProCysLysLeuIleAspLysGlnSerIleSerHisAspValArgLysPheArgPheAlaLeuProSerGluAsp
CCATGCCAACTCATCGACAAGCAATCCATCTCCATGTTAGGAAATTCGATTTGCAATGGCCCTCTGAGGAT
1951 1961 1971 1981 1991 2001 2011
GlnValLeuGlyLeuProValGlyLysHisIlePheLeuCysAlaValIleAspAspLysLeuCysMetArgAla
CAAGTCTTGGGCTTGCCCTGTTGGAAAACATATCTTCTCTGTGCCGTTATTGACGATAAGCTCTGCATGGCGGCT
2026 2036 2046 2056 2066 2076 2086
TyrThrProThrSerThrIleAspGluValGlyTyrPheGluLeuValValLysIleTyrPheLysGlyIleHis
TACAGCCTACTAGCAGATCGATGAGGTGGGGTACTTCGAGTTGGTTGTCAAGATATACTTCAAAGGAATTCAC
2101 2111 2121 2131 2141 2151 2161
ProLysPheProAsnGlyGlyGlnMetSerGlnTyrLeuAspSerMetProLeuGlySerPheLeuAspValLys
CCTAAATTCCTCAATGGAGGGCAAATGTCACAGTATCTTGTATTCTATGCCGTTAGGGTCATTTCTCGACGTGAAA
2176 2186 2196 2206 2216 2226 2236
GlyProLeuGlyHisIleGluTyrGlnGlyLysGlyAsnPheLeuValHisGlyLysGlnLysPheAlaLysLys
GGTCCATTAGGTACATTGAATACCAAGGAAAGGGAAATTTCTTAGTTTCATGGCAAACAGAAGTTTGCCAAGAAG
2251 2261 2271 2281 2291 2301 2311
LeuAlaMetIleAlaGlyGlyThrGlyIleThrProValTyrGlnValMetGlnAlaIleLeuLysAspProGlu
TTGGCCATGATAGCAGGTGGAACAGGAATAACTCCAGTGTATCAAGTCATGCAGGCAATTCGAAAGATCCAGAA
2326 2336 2346 2356 2366 2376 2386
AspAspThrGluMetTyrValValTyrAlaAsnArgThrGluAspAspIleLeuLeuLysGluGluLeuAspSer
GATGACACAGAAATGTATGTGGTGTATCTAACAAGAACAGAGGATGATATTTACTTAAGGAAGAGCTTGATTCA
2401 2411 2421 2431 2441 2451 2461
TrpAlaGluLysIleProGluArgValLysValTrpTyrValValGlnAspSerIleLysGluGlyTrpLysTyr
TGGGCTGAGAAAATTCAGAGAGGGTTAAAGTTTGGTATGTGGTTCCAGGATTCTATTAAGAAGGATGGAAGTAC
2476 2486 2496 2506 2516 2526 2536
SerIleGlyPheIleThrGluAlaIleLeuArgGluHisIleProGluProSerHisThrThrLeuAlaLeuAla
AGCATTGGTTTTATTACAGAAGCCATTTGAGAGAACATATCCCTGAGCCATCTCACACACACTGGCTTTGGCT
2551 2561 2571 2581 2591 2601 2611
CysGlyProProProMetIleGlnPheAlaValAsnProAsnLeuGluLysMetGlyTyrAspIleLysAspSer
TGTGGACCACCTCCTATGATTCAATTTGCTGTTAATCCAACTTGGAGAAGATGGGCTATGACATTAAGGATTC
2626 2636 2646 2656 2666 2676 2686
LeuLeuValPhe***
TTATTSGTGTCTAA
2701 2711

FIG. 10



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
O, X	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 1987, vol. 0, no. 11, partie B, page 24 & 16TH ANNUAL UCLA SYMPOSIUM ON PLANT GENE SYSTEMS AND THEIR BIOLOGY, 2-8 février 1987; M. VINCENTZ et al.: "Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductases from higher plants" * Résumé F 120 *	1-8	C 12 N 15/00 // C 12 N 9/06
A	PROCEEDINGS OF THE NAT. ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 83, no. 21, novembre 1986, pages 8073-8076, Washington, DC, US; N.M. CRAWFORD et al.: "Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation" * Résumé; page 8076, dernier paragraphe *	1-8	
A	PROCEEDINGS OF THE NAT. ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 83, septembre 1986, pages 6825-6828, Washington, DC, US; C.-L. CHENG et al.: "Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA" * En entier *	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 12 N
A	SCIENCE, vol. 233, 25 juillet 1986, pages 478-481; D.M. SHAH et al.: "Engineering herbicide tolerance in transgenic plants" * Page 478, colonne de droite, paragraphe 2 - page 479, colonne de gauche *	8	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 17-06-1988	Examinateur MADDOX A. D.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
P, X	MOL. GEN. GENET, vol. 209, 1987, pages 552-562, Springer-Verlag; R. CALZA et al.: "Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductases from higher plants" * En entier *	1-8	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 17-06-1988	Examineur MADDOX A. D.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	